

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ENTWICKLUNG EINES T-ZELL-DIAGNOSTIKUMS IM ELISPOTFORMAT ZUM
NACHWEIS EINER LYME BORRELIOSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Carmen Putz

2019

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ENTWICKLUNG EINES T-ZELL-DIAGNOSTIKUMS IM ELISPOTFORMAT ZUM
NACHWEIS EINER LYME BORRELIOSE

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Carmen Putz

2019

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. André Gessner

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung:

11.01.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Erkrankung Lyme Borreliose - historischer Hintergrund und Verbreitung.....	1
1.1.1	Historischer Hintergrund.....	1
1.1.2	Epidemiologischer Überblick.....	2
1.1.3	Situation in Bayern.....	3
1.2	Erreger der Lyme Borreliose.....	4
1.2.1	Taxonomie und Einteilung.....	4
1.2.2	Geographische Verteilung der humanpathogenen Subspezies (B. burgdorferi sensu lato).....	5
1.2.3	Morphologie und Kultivierung.....	6
1.2.4	Molekularbiologie.....	7
1.2.5	Proteine und Oberflächenantigene	7
1.3	Infektion mit Borrelia burgdorferi.....	11
1.3.1	Die Zecke als Überträger	11
1.3.2	Pathogenese.....	13
1.3.3	Immunantwort des Wirts.....	14
1.3.4	Immunevasion.....	15
1.3.5	Klinische Manifestationen und Verläufe.....	17
1.3.6	Therapie	21
1.3.7	Prophylaxe und Prävention	21
1.4	Diagnostik der Lyme Borreliose	21
1.4.1	Direkte Nachweismethoden	21
1.4.2	Serologie	22
1.4.3	T-Zell basierte Testsysteme	23
1.5	Ziel der Arbeit.....	24
2	Material	26
2.1	Geräte.....	26
2.2	Verbrauchsmaterial	28
2.3	Chemikalien	30
2.4	Nährmedien für die Zellkultur.....	32
2.5	Puffer und Lösungen für Proteinbiochemische Methoden	32
2.6	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	34
2.7	Plasmide, Bakterienstämme:	35
2.8	Enzyme:	36
2.9	Oligonukleotide:.....	37
2.10	Antikörper, Konjugate:	37
2.11	Substrate.....	38
2.12	Borrelienantigene	39
2.13	Kommerziell erhältliche Kits	39
2.14	Zelllinien.....	40
2.14.1	HEK293T-Zellen (Human embryonic kidney)	40

2.14.2 Sf9-Insektenzellen.....	40
2.15 Software und Datenbanken	41
3 Methoden	41
3.1 Probandenkollektiv	41
3.2 Einschlusskriterien	41
3.3 Ausschlusskriterien	41
3.4 Probengewinnung.....	42
3.5 Probenaufarbeitung	42
3.5.1 Gewinnung von PBMC nach Leucosep-Methode	42
3.6 Serologische Untersuchungen	44
3.6.1 ELISA IgM/IgG	44
3.6.2 Westernblot IgG, IgM	45
3.7 Untersuchung mittels Elispot	45
3.7.1 Prinzip der Elispottechnologie	45
3.7.2 Humaner T-Zell-Elispot mit Borreliantigenen	46
3.8 Herstellung der Vektoren zur Expression in Säugetierzellen	47
3.8.1 Zielsequenzen.....	47
3.8.2 Klonierungsvektoren.....	48
3.8.3 Plasmidverdau:.....	51
3.8.4 Agarosegelelektrophorese	52
3.8.5 QIAquick Gelextraktion.....	53
3.8.6 Ligation	53
3.8.7 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	54
3.8.8 Transformation.....	54
3.8.9 Plasmidpräparation mit QIAprep Spin Miniprep	55
3.9 Proteinexpression in Säugetierzellen.....	55
3.9.1 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien.....	55
3.9.2 Cryokonservierung der 293T-Zellen.....	56
3.9.3 Auftauen der 293T-Zellen.....	56
3.9.4 Transfektion	56
3.10 Proteinexpression durch Insektenzellen	57
3.10.1 Auswahl der Primer.....	57
3.10.2 Durchführung der PCR und Einfügen der Schnittstelle für EcoRI.....	58
3.10.3 DNA-Extraktion aus Agarosegel	59
3.10.4 Einfügen der VlsE-Sequenzen in den pFastBac-Vektor.....	59
3.10.5 Transformation und Transposition	60
3.10.6 Isolation der rekombinanten Bacmid-DNA	60
3.10.7 PCR zur Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA.....	61
3.10.8 Zellkultur von Insektenzellen.....	62
3.10.9 Kryokonservierung der Sf9-Zellen.....	62
3.10.10 Auftauen der Sf9-Zellen.....	63
3.10.11 Transfektion der Zellen mit Bacmid DNA.....	63

3.10.12 Virusernte und Aufbewahrung.....	64
3.10.13 Genexpression in Insektenzellen.....	64
3.11 Proteinbiochemische Methoden	64
3.11.1 SDS-Gel-Elektrophorese.....	64
3.11.2 Westernblot.....	65
3.11.3 Dotblot	66
3.11.4 Direkter ELISA mit anti-Flag-M2 als Detektionantikörper	66
3.11.5 Coomassiefärbung nach Kang.....	67
3.11.6 Silberfärbung.....	68
3.11.7 Affinitätschromatographie mit Anti-Flag-Sepharose	68
4 Ergebnisse	70
4.1 Herstellung der Expressionsvektoren für Säugetierzellen.....	70
4.1.1 Verdau und Auftrennung der Klonierungsvektoren.....	70
4.1.2 Extraktion der VlsE-Genfragmente aus dem Agarosegel	70
4.1.3 Elektrophoretische Auftrennung der Expressionsvektoren nach Transformation und Klonierung.....	72
4.2 Proteinexpression in HEK 293T Zellen	74
4.2.1 Experiment über die Transfektionseffizienz mit verschiedenen Nährmedien.....	74
4.2.2 Transfektion der Expressionsvektoren	76
4.3 Nachweis der durch HEK293T hergestellten Proteine.....	77
4.3.1 Ergebnisse zu Eigenschaften und Stabilität der rekombinanten Proteine	77
4.3.2 Proteinnachweis im Westernblot nach Transfektion in DMEM	77
4.3.3 Proteinnachweis im Westernblot nach Transfektion in DMEM/AIMV.....	78
4.3.4 Versuch der Quantifizierung mittels Kolloidaler Coomassiefärbung nach Kang	79
4.3.5 Orientierenden Quantifizierung mittels Silberfärbung.....	79
4.3.6 Versuch der Quantifizierung mittels ELISA	79
4.3.7 Ergebnisse der Proteinreinigung	81
4.4 Herstellung einer Bacmid-DNA für das Baculoexpressionssystem	82
4.4.1 Einfügen der Schnittstelle für EcoRI	82
4.4.2 Einfügen der VlsE-Genfragmente in den pFastBac-Vektor.....	83
4.4.3 Bacmidpräparation.....	86
4.4.4 Transfektion der Sf9-Zellen mit rekombinanten Bacmid.....	87
4.4.5 Proteinnachweis mittels Silberfärbung im Time Course.....	94
4.4.6 Dotblot mit anti-Flag zum Nachweis der VlsE-Varianten aus dem Baculosystem	98
4.4.7 Nachweis der mittels Baculosystem produzierten VlsE-Varianten im Westernblot	99
4.4.8 Proteinreinigung mit anti-Flag-Sepharose.....	103
4.5 Vergleich VLSE Vollantigen versus Teilantigen.....	104
4.5.1 Elispot mit VlsE-Varianten aus HEK-293T-Zellen	104
4.5.2 Elispot mit VlsE-Varianten aus Sf9-Zellen.....	106
5 Diskussion.....	108
5.1.1 Lyme Borreliose – ein diagnostisches Dilemma?	108
5.1.2 Rekombinante Synthese einzelner VlsE-Fragmente	110
5.1.3 Die Elispottechnologie und ihr möglicher Stellenwert in der Borreliosediagnostik	112

5.1.4 Ausblick	114
6 Zusammenfassung	117
7 Anhang	119
7.1 VlsE-Varianten DNA- und Aminosäuresequenzen	119
7.2 Abbildungsverzeichnis:	124
8 Abkürzungsverzeichnis	126
9 Literaturverzeichnis	128
10 Danksagung	141
11 Erklärung	142

1 Einleitung

1.1 Die Erkrankung Lyme Borreliose - historischer Hintergrund und Verbreitung

1.1.1 Historischer Hintergrund

Die Lyme Borreliose ist als klinische Diagnose noch relativ jung. Die erste Beschreibung einer ihrer Hautmanifestationen, heute bekannt als Acrodermatitis chronica atrophicans, geschah aber bereits 1883 durch Buchwald [1,2]. 1909 beschrieb der schwedische Arzt Arvid Afzelius erstmals das „Erythema migrans“, eine sich ringförmig ausbreitende Hautrötung mit zentraler Aufhellung die nach einem Zeckenbiss auftrat [2–4]. In den Ortschaften Lyme, Old-Lyme und East Haddam in Connecticut, USA, wurden 1976 vermehrt Fälle von Gelenkbeschwerden in Form von asymmetrisch wiederkehrenden Schmerzen und Schwellungen registriert, denen eine typische Hautveränderung vorausging. Diese Form der Arthritis erhielt deshalb den Namen „Lyme Disease“. Das auslösende Agens war zu der Zeit noch nicht bekannt, eine Übertragung durch bestimmte Arthropoden als Vektoren wurde aber bereits vermutet [5]. Zunächst bestand die Hypothese, es handelt sich um eine allergische Reaktion auf ein Zeckentoxin, welches während des Saugaktes in den Menschen transferiert wird. Doch nachdem Hollström darstellte, dass sich die Therapie mit Penicillin positiv auf die Entwicklung des Erythema chronicum migrans (ECM) auswirkt, wurde diese Hypothese, ebenso wie eine mögliche virale Genese, verworfen [6]. Binder konnte bei freiwilligen Probanden, durch Transfer von Gewebeproben verdächtiger Hauterscheinungen, ein Erythema migrans auslösen. In Folge dessen war eine infektiöse Genese sehr wahrscheinlich geworden [7]. 1948 beobachtete Lennhoff in verschiedenen Hautbiopsien spiralförmige Strukturen. Daraufhin wurden Spirochäten als Erreger diskutiert [8]. 1982 entdeckten Burgdorfer et al. das ursächliche Agens. Sie fanden ein spiralförmig gewundenes Bakterium im Mitteldarm von Zecken (*Ixodes dammini*), welche auf Shelter Island, einem bekannten Endemiegebiet der Lyme Disease, gefunden wurden [9]. Barbour et al. konnten kurze Zeit danach bei betroffenen Patienten Antikörper gegen Bestandteile der aus *Ixodes dammini* isolierten Spirochäte nachweisen [10]. Nachdem das Bakterium später auch aus Gewebeproben von Erythema migrans und Blut von Patienten mit Lyme Disease kultiviert werden konnte, stand es schließlich als ursächlicher Erreger der Erkrankung fest [11]. Die Spirochäte

wurde 1983 zu Ehren ihres Entdeckers Willy Burgdorfer, *Borrelia burgdorferi*¹ genannt. Schrittweise konnte ein Zusammenhang zwischen dem amerikanischen Krankheitsbild „Lyme Disease“ und den verschiedenen europäischen Entitäten, wie z.B. Erythema migrans oder Acrodermatitis chronica atrophicans, durch weitere Nachweise von *B. burgdorferi* aus Hautbiopsien herausgearbeitet werden [12,13]. Obwohl also die klinischen Verläufe auf den beiden Kontinenten voneinander abwichen, musste man angesichts der gleichen Erregergattung davon ausgehen, dass es sich im Grunde um dieselbe Krankheit handelt. Nach Übereinkunft auf dem 2. Internationalen Lyme-Symposium 1985 in Wien, wurden amerikanisches und europäisches Krankheitsbild gleichermaßen als „Lyme-Borreliose“ bezeichnet [14]. Die klinische Variabilität zwischen den in USA und Europa auftretenden Infektionen, ist auf die unterschiedliche Verbreitung der Genospezies zurückzuführen. So kommt *B. burgdorferi sensu stricto* vorwiegend in Nordamerika und *B. garinii* sowie *B. afzelii* in Europa vor [15].

1.1.2 Epidemiologischer Überblick

Die Lyme Borreliose ist eine weltweit auftretende Erkrankung, obwohl sie hauptsächlich auf die nördliche Hemisphäre, zwischen dem 40. und 60. Grad begrenzt ist. Sie kommt in Nordamerika (von der mexikanischen Grenze bis zu südlichen Provinzen Kanadas), gesamt Europa, Nordafrika (Maghreb) und im Norden Asiens (Sibirien, Sakhalin, Japan, China und Korea) vor. Mögliche Fälle in der südlichen Hemisphäre, wurden nie verlässlich nachwiesen. Die Endemiegebiete entsprechen den Verbreitungsgebieten ihrer Vektoren [16,17]. Verlässliche Zahlen zur Verbreitung der Erkrankung zu erlangen, gestaltet sich schwierig. Zum einen, weil die typischen Symptome wie Erythema migrans entweder nicht auftreten, oder in bestimmten Regionen durch die Bevölkerung nicht wahr- bzw. ernst genommen werden. So bleibt ein gewisser Prozentsatz unterdiagnostiziert [18]. Da die Lyme Borreliose in vielen Ländern nicht meldepflichtig ist, muss man damit rechnen, dass die erhobenen Inzidenzraten verzerrt sind, obwohl die Erkrankung richtig diagnostiziert wurde. Viele Daten wurden in Rahmen von Studien aus Endemiegebieten erhoben und spiegeln so nur schätzungsweise die tatsächlichen Zahlen wieder. Die jährlichen Fallzahlen aus Ländern ohne vorgeschriebene

¹ In dieser Arbeit ist der besseren Lesbarkeit wegen, der Begriff *Borrelia burgdorferi sensu lato* nur durch den Namen *Borrelia burgdorferi* beschrieben.

Meldepflicht werden in Europa auf 65.467, in Asien auf 3.450, und in Nordamerika auf 16.340 geschätzt [16]. Viele Experten sind aber der Meinung, dass die tatsächlichen Fallzahlen zwei bis dreimal höher angenommen werden sollten. In Europa wurden epidemiologische Studien zur Lyme Borreliose nur selten durchgeführt. Eine Untersuchung aus Schweden aus dem Jahr 1995 zeigt eine Inzidenz von 69/100000 Einwohner [19]. Die Fallzahlen für Deutschland bewegen sich zwischen 25 und 40 pro 100000 Einwohner, hier ist auch auf das Problem der fehlenden Meldepflicht und unzureichenden epidemiologischen Studienlage hinzuweisen. Einzig für die Länder Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen können gemeldete Daten aufgeführt werden. Hier liegt die Inzidenz im Zeitraum von 2002 - 2006 bei 26,05/100000 Einwohner [16,20].

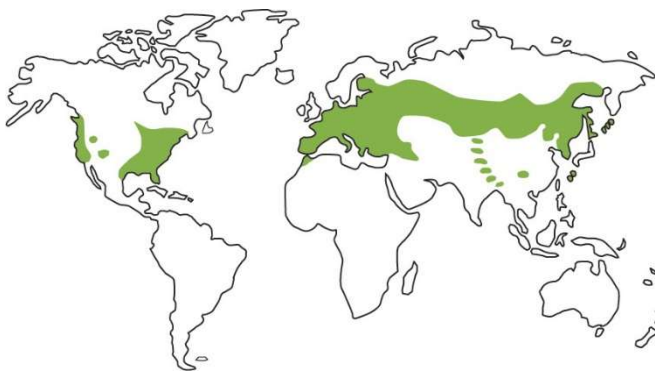


Abbildung 1.1: Die globale Verbreitung von Ixodes-Zecken die B. burgdorferi beinhalten [15]

1.1.3 Situation in Bayern

Im Bundesland Bayern ist die Lyme Borreliose seit dem 01.03.2014 meldepflichtig. Der Meldung unterliegen die drei häufigsten klinischen Manifestationen, nämlich das Erythema migrans, die akute Neuroborreliose und die Lyme-Arthritis. Die Daten des ersten Meldejahres ergeben eine Inzidenz von 48,8 Fällen pro 100000 Einwohner. Dabei zeigt sich das Erythema migrans mit 95,8 Prozent, als die mit Abstand häufigste Manifestationsform. Betrachtet man die Daten im zeitlichen Verlauf, lässt sich, wie schon frühere Studien zeigen, eine saisonale Häufung erkennen. In der Regel zeigt sich ein unimodales Häufigkeitsmuster der jährlichen Inzidenz mit einem Maximum im Frühsommer (Mai bis Juli). In Europa tritt ein weiterer Peak im Herbst

auf [16]. Die Saisonalität geht auf die Zeckenaktivität und der Aktivität der Menschen im Zeckenhabitat zurück. Dabei muss bedacht werden, dass die ersten Symptome aufgrund der Inkubationszeit, ungefähr um vier Wochen verzögert auftreten. Der Gipfel der Meldungen liegt in Bayern im Juli mit circa 350 Fällen pro Meldewoche [16,21].

Die geographische Verteilung der Borreliosefälle in Bayern zeigt, dass die Region Bayrischer Wald das höchste Infektionsrisiko aufweist. Für die geographischen Unterschiede sind eine Reihe von Faktoren, wie lokale Zeckendichte, Durchseuchung der Zecken mit Borrelien oder ökologische Einflüsse, wie Klima und Vorkommen von geeigneten Wirtstieren verantwortlich [21].

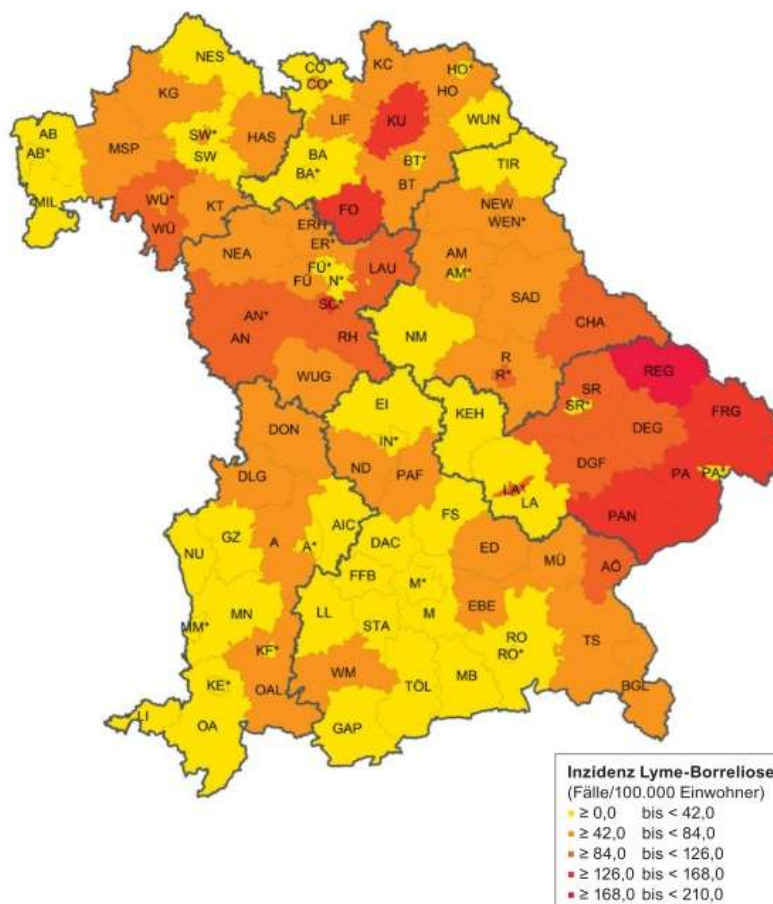


Abbildung 1.2: Inzidenzkarte der Lyme Borreliose in Bayern [21]

1.2 Erreger der Lyme Borreliose

1.2.1 Taxonomie und Einteilung

Borrelien werden der Familie der Spirochaetaceae zugeordnet. Hierbei handelt es sich um gramnegative, spiralförmig gewundene Bakterien. Zur Familie der

Spirochaetaceae gehören auch weitere humanpathogene Arten wie *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis, einer sexuell übertragbaren Multisystemerkrankung, oder *Leptospira interrogans*, dem Erreger der Weil-Krankheit, einer fieberhaft verlaufenden Zoonose.

Die Gattung *Borrelia* wird in zwei große Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe umfasst Borrelien, welche das sogenannte Rückfallfieber verursachen. Hierzu zählen beispielsweise *B. recurrentis*, *B. hermsii* u.v.m. Die zweite Gruppe beinhaltet *B. burgdorferi*, deren genotypische Vielfalt mittels verschiedener Verfahren wie Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analysen (RFLP), DNA-Hybridisierungen oder Multilocus-Sequenztypisierungen gezeigt werden konnte [22–24]. Daraufhin war die Einführung des Oberbegriffes *B. burgdorferi sensu lato* erforderlich. Innerhalb dieses Komplexes sind bis dato 18 verschiedene Spezies beschrieben: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, welche für den Menschen als pathogen gelten. Sowie *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. andersonii*, *B. bissettii* und weitere. Diesen Spezies, konnte bisher noch keine humanpathogene Bedeutung zugeschrieben werden [17,23–26]. Eine weitere Subtypisierung innerhalb der Spezies, wird auch anhand der phänotypisch ausgeprägten Oberflächenantigene (Verschiedene Typen von: OspA, OspB, OspC) vorgenommen.

1.2.2 Geographische Verteilung der humanpathogenen Subspezies (*B. burgdorferi sensu lato*)

Die pathogenen *Borrelia* Spezies zeigen keine gleichmäßige geographische Verteilung. Faktoren wie Wirts- oder Vektorspezifität und klimatische Verhältnisse beeinflussen das weltweite Vorkommen. In Nordamerika kommt ausschließlich *B. burgdorferi sensu stricto* als Erreger der Lyme-Borreliose vor. *B. burgdorferi sensu stricto* verursacht auch in Europa Infektionen, allerdings relativ begrenzt auf Westeuropa [26]. In Europa kommen bisher fünf verschiedene Spezies als Erreger der Erkrankung vor: *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. burgdorferi* und *B. bavariensis*. Letztere ist eng verwandt mit *B. garinii*. Deshalb herrscht dort auch eine größere Bandbreite an klinischen Manifestationen vor als in den USA. Die meisten Infektionen in Europa werden *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. bavariensis* (früher als *B. garinii* Serotyp 4 bezeichnet) zugeschrieben. *B. spielmanii* wird seltener isoliert

[27,28]. Die Spezies werden weit verbreitet in Europa und Asien nachgewiesen. *B. garinii* scheint besonders neurotrop zu sein, weil diese Unterart häufiger mit Radikulopathien und Enzephalomyelitiden assoziiert ist, wohingegen *B. afzelii* eher Hautmanifestationen, wie die Acrodermatitis chronica atrophicans verursacht [29,30].

1.2.3 Morphologie und Kultivierung

Borrelien sind gramnegative Bakterien mit schraubenzieherartigen und unregelmäßig verteilten Windungen. Sie lassen sich mit den gängigen Färbemethoden wie Gram oder Giemsa darstellen. In der Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskopie, kann die typische schraubenartige Bewegung beobachtet werden [31]. Der mikroskopische Erregerdirektnachweis aus Patientenmaterial, gelingt aufgrund der niedrigen Erregerdichte allerdings selten. Die Länge beträgt ca. 10 – 30 µm, die Breite ca. 0,25 - 0,3 µm [20,31,32]. Charakteristisch ist die außergewöhnliche Zellanatomie. Wie alle gramnegativen Bakterien, besitzen Borrelien eine innere Membran, die den Protoplasmazyylinder umgibt. Diese innere Membran wiederum, ist bei Borrelien trilaminär aufgebaut und umgibt zwischen mittlerer und äußerer Lamina einen periplasmatischen Raum, welcher 7 - 11 sogenannte Endoflagellen beinhaltet. Die Endoflagellen inserieren an den Bakterienenden und ermöglichen durch Kontraktion die Fortbewegung. Da die Flagellen im Inneren liegen und nicht an der Bakterienoberfläche, wird den Borrelien auch die Bewegung in visköser Flüssigkeit, wie beispielsweise extrazellulärer Matrix, ermöglicht. An die äußerste Lamelle schließt sich der sogenannte S-Layer, die äußere Membran an [20,32]. Der S-Layer beinhaltet verschiedene Lipoproteine, sogenannte „outer surface proteins“, abgekürzt Osp. Diese Oberflächenantigene, werden einerseits diagnostisch genutzt, fungieren aber zum Teil auch als Pathogenitätsfaktoren [33]. Bemerkenswert ist außerdem, dass Borrelien nicht wie die anderen Bakterien ein ringförmiges, sondern ein lineares Chromosom, sowie zusätzlich ca. 20 lineare und zirkuläre Plasmide besitzen [17]. Da Borrelien anspruchsvolle Bakterien sind, wachsen sie auf herkömmlichen Kulturmedien, wie Blut- oder Kochblutagar nicht an. Das mikroaerophile Bakterium lässt sich aber in Spezialmedien wie dem Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK-Medium) kultivieren. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 34 und 37°C [34,35]. Die Generationszeit beträgt etwa 7- 20 Stunden [31].

1.2.4 Molekularbiologie

Durch die Sequenzierung des *B. burgdorferi sensu stricto* Stammes B31, welche 1997 durch Fraser et. al. publiziert wurde, ist das vollständige Genom des Erregers bekannt. Es besteht aus einem linearen Chromosom mit 910725 Basenpaaren und mindestens 17 zirkulären und linearen Plasmiden mit einer Gesamtgröße von 533000 Basenpaaren. Das Chromosom enthält 853 Gene, welche für die Replikation, Transkription, Translation und Regulation des Metabolismus verantwortlich sind. Es fehlen Gene für die Produktion bestimmter Aminosäuren, Fettsäuren, Enzymkofaktoren oder Nukleotide. Dies erklärt, weshalb *Borrelia burgdorferi* nur in Spezialnährmedien kultiviert werden kann, welche die fehlenden Faktoren beinhalten. Die Energiebereitstellung erfolgt hauptsächlich glykolytisch. Die dafür nötige Enzymausstattung ist in den jeweiligen Genen codiert. Als primäre Energiequelle dient dabei Glukose, aber auch Glycerol, Glucosamin, Fructose oder Maltose, können verstoffwechselt werden. Die Regulation der Genexpression ist von mehreren Faktoren abhängig: der Art des Wirts, der Umgebungstemperatur, der genauen Lokalisation innerhalb des Wirts und weiteren. Für die Regulation existieren u.a. sogenannte „Heat shock response genes“, an diese Stellen im Genom können bestimmte Proteine (Heat shock proteins) binden und die Genexpression beeinflussen [36–38].

1.2.5 Proteine und Oberflächenantigene

Die Untersuchung der verschiedenen Proteine und Oberflächenstrukturen, steht seit der Entdeckung des Erregers im Zentrum des Interesses. Nicht nur um die Pathomechanismen der Erkrankung zu verstehen, sondern auch um diagnostische Tests oder Impfstoffe zu entwickeln.

Die äußere Membran von *B. burgdorferi* setzt sich zu 45,90 % aus Protein, 50,75% Lipiden und 3,33% Kohlehydrate zusammen [39].

Das Genom von *B. burgdorferi* codiert für verschiedene Lipoproteine, die sich in der äußeren Membran und somit an der Bakterienoberfläche befinden [37]. Diese Oberflächenantigene, spielen eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktoren. So interagieren sie mit Wirtsstrukturen und sorgen dafür, dass der Lebenszyklus und die Übertragung zwischen den Wirtsorganismen funktioniert. Beispielsweise, binden bestimmte Lipoproteine an Glycosaminoglycanen, Decorin oder Fibronectin. Dabei

handelt es sich um Bestandteile der extrazellulären Matrix [40]. Eine weitere Funktion der Oberflächenantigene ist es, sich durch Variation derselben, der Immunantwort des Wirts zu entziehen. Außerdem gibt es Proteine, die für die Interaktion mit Strukturen in der Zecke von Bedeutung sind und deshalb auch nur innerhalb der Zecke exprimiert werden. Umgekehrt werden andere Lipoproteine hochreguliert, sobald *B. burgdorferi* sich in einem Säugetierorganismus befindet [41].

Die Oberflächenantigene OspA und OspB werden nur von Borrelien im Darm nüchterner Zecken exprimiert. Die beiden Proteine, scheinen eine wichtige Rolle für die Persistenz im Zeckendarm zu spielen. OspA vermittelt dabei die Adhäsion an Zellen der Darmwand. Beginnt die Zecke mit dem Saugakt, erhöht sich die Umgebungstemperatur, OspA wird herunterreguliert und die Borrelien gelangen in die Speicheldrüsen des Vektors. Während OspA phylogenetisch konserviert ist, weist OspC eine hohe Sequenzvariabilität auf. OspC ist sehr immunogen und wird während des Saugaktes der Zecke verstärkt exprimiert. Deshalb wird dem Protein eine entscheidende Rolle für die Übertragung und Infektion des Wirts beim Saugakt zugeschrieben [17,40,42].

Zwei weitere wichtige Proteine sind DbpA und DbpB (decorin binding protein A und B), sie sind in der Lage an Decorin zu binden. Decorin wird von Fibroblasten gebildet und zählt zu den Proteoglykanen. Da es Kollagen bindet ist es in vielen Geweben in der extrazellulären Matrix anzutreffen. DbpA und DbpB vermitteln durch die Bindung an Decorin die Interaktion mit dem Bindegewebe. Die beiden Proteine scheinen eine wichtige Rolle für die Verbreitung der Borrelien im Säugetierwirt zu spielen. Weniger essentiell hingegen scheinen sie für die primäre Infektion zu sein [40,43].

B. burgdorferi besitzt ein 28 kB großes lineares Plasmid, welches eine sogenannte vmp-like Sequenz (vls) enthält. Vmp (variable major protein) findet sich bei *B. hermsii*, eine zu den Rückfallfieber verursachenden Spezies gehörend, und ist für dessen hohe Variabilität verantwortlich. Entsprechend zeigt auch *B. burgdorferi*, durch diese genetische Ausstattung, eine hohe Antigenvariabilität. DNA-Sequenzanalysen zeigten, dass der vls-Locus auf dem Plasmid aus einem exprimierenden VlsE-Gen und 15 stummen vls-cassetten aufgebaut ist. Das VlsE-Gen codiert für ein 34 kDa großes Lipoprotein, welches sich auf der Bakterienoberfläche befindet [44]. Jede der 15 vls-cassetten ist über 90% mit dem zentralen Bereich von VlsE identisch (sechs hochkonservierte Regionen), enthält aber auch sechs davon abweichende, sogenannte variable Regionen (VR I bis VR

VI). Durch bestimmte Stimuli im Säugerorganismus, können Segmente der verschiedenen *vls*-cassetten, in den zentralen Teil von *VlsE* rekombinieren und dadurch eine sehr hohe genetische, sowie phänotypische Vielfalt generieren. Die variablen Bereiche des Genprodukts befinden sich an der dem Bakterium abgewandten Seite, welche eine höhere Wahrscheinlichkeit hat, mit Antikörpern oder Immunzellen in Kontakt zu kommen [38,40,44,45]. Durch diese Antigenvielfalt ist es den Borrelien möglich sich der Immunantwort des Wirts effektiv zu entziehen.

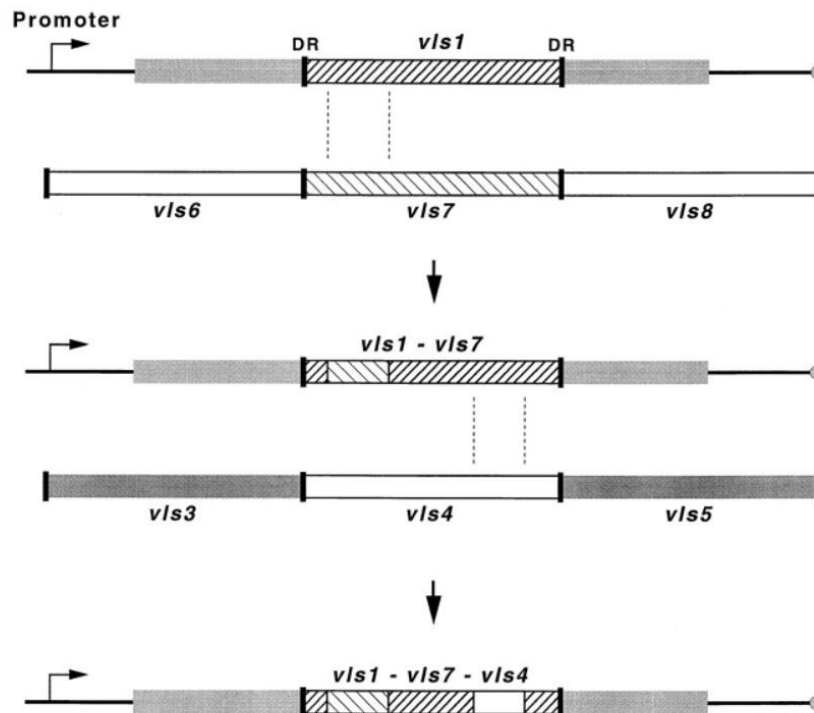


Abbildung 1.3: Die Rekombination im *VlsE*-Gen [44]

Da in dieser Arbeit das *VlsE*-Antigen von besonderem Interesse ist, wird auf die Eigenschaften des Proteins näher eingegangen. Das Oberflächenprotein tritt in Lösung als Oligomer auf und seine Sekundärstruktur wird von α -Helices dominiert. An der Bakterienoberfläche tritt es vermutlich als Dimer auf [46,47]. Die thermische Denaturierung erfolgt bei ca. 40°C vom Oligomer zum Monomer, gefolgt von einer Proteinentfaltung bei ca. 55°C. Unter den Proteinen, die einer hohen Antigenvariation unterliegen, ist *VlsE* mit einer über 75% konstanten Primärstruktur eher ein atypischer Vertreter. Der konstante Bereich des Proteins befindet sich an den N- und C-Terminalen und macht bereits über die Hälfte der Gesamtgröße aus. Die beiden konstanten Enden, umgeben wiederum sechs weitere kleinere invariable Regionen

(IR1 bis IR6), die abwechselnd mit den zentralen variablen Bereichen durchsetzt sind (siehe Abb. 1.4) [47,48]. Für invariable Anteile von Proteinen, die in die Antigenvariation von Krankheitserregern eingebunden sind, ist es eher untypisch, dass ein konstanter Bereich, nämlich IR6, besonders immunogen ist [48,49]. Diese Region, befindet sich zwar an der Proteinoberfläche, wird das Protein jedoch an der Bakterienoberfläche exprimiert, ist sie für Antikörper nicht zugänglich [48,50]. Strukturanalysen des Proteins konnten zeigen, dass IR6 durch Loops aus variablen Regionen abgeschirmt wird und so wahrscheinlich der Antikörperantwort des Wirtes entgeht [46].

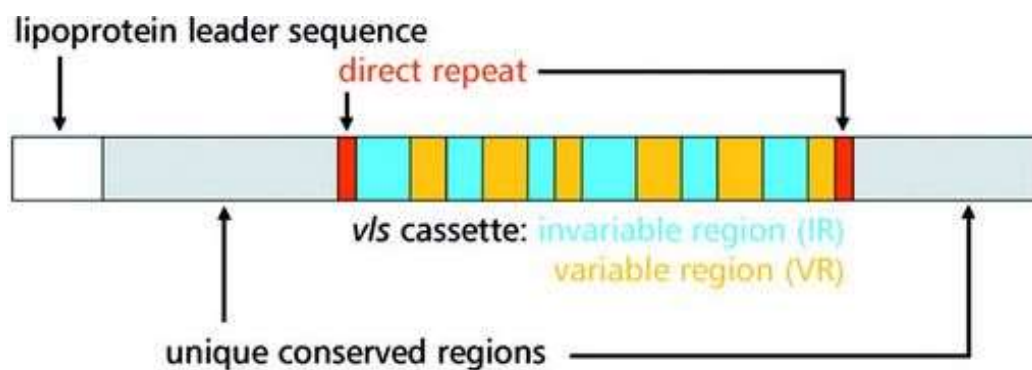


Abbildung 1.4: Aufbau von vlsE, Variable (VR) und Invariable (IR) Regionen [46]

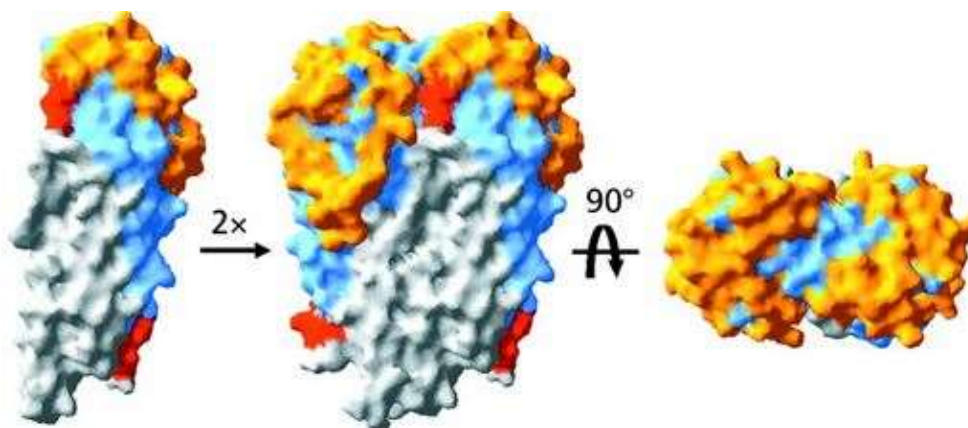


Abbildung 1.5: VlsE-Struktur, VR's orange IR's blau. Die IR's werden von den VR's nach außen weitgehend abgeschirmt. An der Borrelienoberfläche tritt es vermutlich als Dimer auf [46].

Die Oberflächenproteine von *B. burgdorferi* unterliegen einem ständigen Wandel, der von verschiedensten Faktoren abhängig ist. So beeinflusst die Krankheitsdauer, die

Umgebungsbedingungen, der Gewebetyp in dem sich *Borrelia* aufhält und die Immunantwort des Wirts die Expression der Oberflächenproteine [41,51,52].

Die Nomenklatur der einzelnen Proteine wurde noch nicht vereinheitlicht. Zunächst wurden sie anhand ihres Molekulargewichts mit p (für Protein) und der entsprechenden Zahl für die Größe in Kilodalton (z.B. p31) benannt. Als nach und nach die Lokalisationen und Funktionen bekannt wurden, erhielten sie die entsprechenden Eigennamen (z.B. Osp für Outer surface protein).

1.3 Infektion mit *Borrelia burgdorferi*

1.3.1 Die Zecke als Überträger

Als Vektoren, welche die Borrelien auf das Wirtssäugetier übertragen, dienen Zecken der Gattung *Ixodes* (Schildzecke). In Europa, fungiert *Ixodes ricinus* als Hauptvektor, während in Asien *Ixodes persulcatus* der häufigste Überträger ist. In den USA sind zwei *Ixodes*arten für die Übertragung von Bedeutung. *Ixodes scapularis* in den Bundesstaaten der Ostküste sowie in den nördlichen Staaten und *Ixodes pacificus* entlang der Westküste Nordamerikas [53,54].

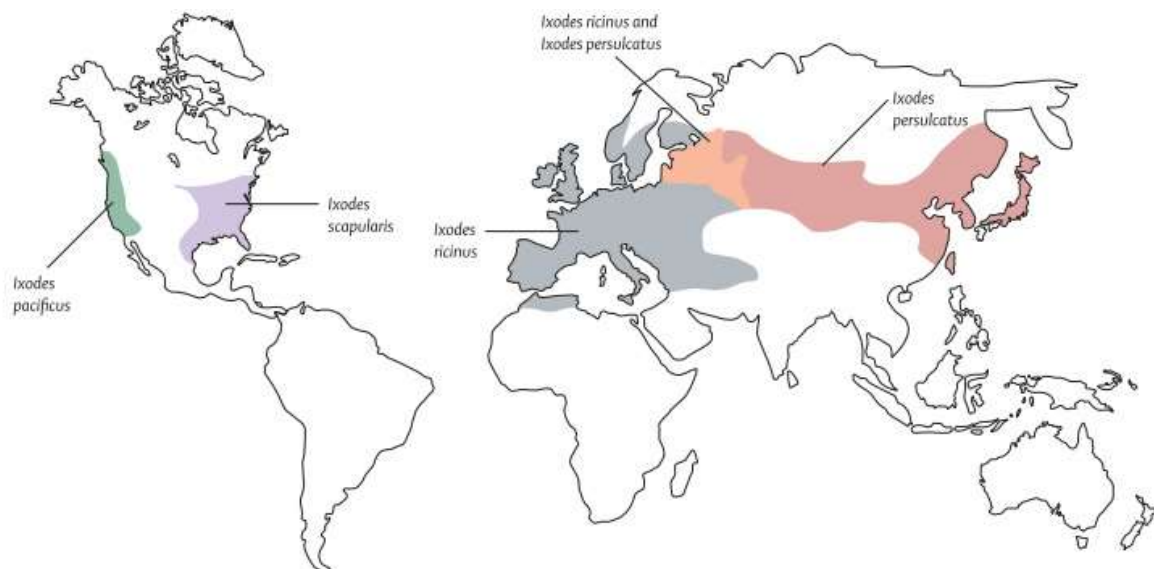


Abbildung 1.5: Die weltweite Verteilung der Vektoren der Lyme Borreliose [53]

Die Zecken entwickeln sich über einen, vier Stadien umfassenden, Lebenszyklus. Vom Ei, über das Larven- und Nymphenstadium, bis hin zum adulten Tier. Zwischen den Stadien ist für jede Metamorphose und zuletzt auch für die Eiablage eine Blutmahlzeit notwendig. Die männlichen Tiere benötigen weniger Blutmahlzeiten als

die Weibchen [53]. Die Dauer des Lebenszyklus ist abhängig von der jeweiligen Zeckenart und beträgt ein bis drei Jahre. Die optimalen Lebensbedingungen sind für Zecken die gemäßigten Klimazonen mit einer Temperaturspanne von -10°C bis 35°C. Extremwerte sollten aber nur von kurzer Dauer sein. Sie benötigen eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit, die idealerweise über 80% liegt. Diese Konditionen sind in Deutschland in der Regel im Frühsommer und Spätherbst erfüllt, so dass zu diesen Jahreszeiten die höchste Zeckenaktivität nachzuweisen ist [55]. Das optimale Zeckenbiotop ist das Unterholz im Wald, Sträucher, Büsche und hohes Gras. Sie befinden sich in der Regel bis zu einer Höhe von einem Meter. Fallen also, entgegen dem weitverbreiteten Irrglauben, nicht von großen Bäumen auf ihren Wirt herab. Die Zecken (auch Larven/Nymphen) warten an Grashalmen oder Sträuchern, bis ein geeigneter Wirt vorüberzieht. Sie besitzen zur Wahrnehmung von Vibrationen sogenannte Haller'sche Organe, welche am vorderen Beinpaar platziert sind. Hat sich ein geeigneter Wirt gefunden, lässt sie sich auf diesen fallen und klammert sich mit den Beinen an ihm fest. Dann sucht sie sich einen geeigneten Ort, um mit ihrem Stechapparat die Haut des Wirtes zu perforieren. Während des Saugaktes, sezerniert die Zecke mit ihren Speichel, antikoagulatorisch, anästhetisch und antiphlogistisch wirkende Substanzen [56]. Die Dauer des Saugaktes ist vom Zeckenstadium abhängig. Adulte Weibchen saugen fünf bis neun Tage, Männchen deutlich kürzer [57]. Ixodesarten befallen eine breite Spanne von Wirtstieren. Larven und Nymphen halten sich in geringer Höhe auf und bevorzugen deshalb kleine Nagetiere aber auch verschiedene Vögel. Die adulten Zecken steigen bis zu einem Meter auf und nehmen deshalb auch größere Tiere wie Rehe, Füchse, sowie Hunde und Katzen als Wirt. Der Mensch kann von allen Stadien befallen werden [54,55]. Die Durchseuchung der Zecken mit *B. burgdorferi* liegt in Deutschland, abhängig von der Region, zwischen 5-35% [17]. Die Wahrscheinlichkeit der Übertragung, steigt mit der Dauer des Saugaktes. Die maximale Übertragungsrate findet sich nach zwei bis drei Tagen. Das Risiko, sich bei einem Zeckenstich mit *B. burgdorferi* zu infizieren liegt bei 2-3%. Das Risiko, eine klinisch manifeste Borreliose zu entwickeln, bei 1-2% [17,58–60].

1.3.2 Pathogenese

Während des Saugaktes der Zecke, wandern die Borrelien unter Veränderung ihrer Oberflächenproteine von OspA und OspB nach OspC, vom Zeckendarm in die Speicheldrüsen ein. Dieser Prozess dauert ca. 24 Stunden, weshalb die Übertragung noch nicht unmittelbar nach dem Zeckenstich abläuft [61]. Die Spirochäten gelangen mit dem Speichel der Zecke in die Hautschichten des Wirtes. Der Speichel beinhaltet Substanzen, die der Zecke den Saugakt erleichtern. Aber auch die Borrelien profitieren von bestimmten Inhaltsstoffen des Speichels. So werden durch ihn bestimmte Zytokine von Th2-Zellen induziert, welche die zelluläre Immunantwort des Wirts supprimieren [62]. In der Haut des Wirts angekommen, vermehren sich die Borrelien und breiten sich zentrifugal aus. Dabei kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion, welche sich durch eine expandierende Hautrötung zeigt. Die äußere Grenze der Rötung entspricht dabei der Erregerfront. Im Zentrum kann die Rötung wieder verblassen. Diese Hauterscheinung wird Erythema migrans genannt und stellt die Erstmanifestation der Lyme Borreliose dar. Kann das Immunsystem mit den lokalen Abwehrmechanismen, wie Granulozyten und Makophagen, den Erreger eliminieren, ist die Erkrankung überwunden. Unterstützend wirkt hierbei die Gabe von Antibiotika. Gelingt es dem Erreger aber der lokalen Abwehrreaktion zu entkommen, können sie Gewebs- und Gefäßbarrieren überwinden und über das Lymph- und Blutgefäßsystem in den gesamten Körper disseminieren [53]. Ein wichtiger Mechanismus bei der Verbreitung des Erregers ist die Adhärenz zu Wirtszellen sowie zu Proteinen der extrazellulären Matrix, welche über bestimmte Proteine auf der Bakterienoberfläche vermittelt wird. Im Gegensatz zu anderen Bakterien, die nach ihrer Inokulation ins Gewebe häufig Enzyme freisetzen, um die extrazelluläre Matrix zu verdauen und aufzulockern, sind bei Borrelien solche Substanzen nicht bekannt. Sie nutzen im Gegensatz dazu die Bindung wirtseigener Proteine wie Plasmin. Plasmin ist eine Serinprotease, die in der Lage ist Metalloproteasen zu aktivieren. Diese Proteasen können eine Vielzahl von Matrixproteinen degradieren [63]. Plasminogen, die Vorstufe von Plasmin, wird hierfür über das Oberflächenprotein OspC von *B. burgdorferi* gebunden [64]. Nach Auflockerung der extrazellulären Matrix, kann der Erreger sich dann durch seine Eigenbewegung verteilen. Dabei scheint es vom Genotyp abhängig zu sein, wie invasiv und disseminierend die Infektion letztlich verläuft [65].

Die Infektion kann unbehandelt über Jahre hinweg bestehen. Die Borrelien scheinen dabei, in geringer Zahl in den jeweiligen Geweben, zu persistieren. Welches Gewebe letztendlich betroffen ist, hängt unter anderem von der Borrelienspezies ab. Während *B. burgdorferi sensu stricto* in den USA eher Gelenkmanifestationen verursacht, isoliert man *B. afzelii* in Europa häufiger in Hautläsionen, wie der Acrodermatitis chronica atrophicans [66]. In den Spätstadien, kann sich Borrelia durch ihre starke Antigenvariabilität dem Immunsystem entziehen und in Gewebsnischen persistieren [41,64]. Eine dauerhafte oder auch rezidivierende Immunreaktion mit folgender Gewebeschädigung, scheint aber trotzdem abzulaufen, da die Beschwerden häufig schubweise auftreten.

1.3.3 Immunantwort des Wirts

Die erste Reaktion auf die in den Wirtsorganismus eingedrungenen Borrelien, ist auf das angeborene Immunsystem zurückzuführen. Makrophagen und dendritische Zellen erkennen unspezifisch, mit Hilfe ihrer „Pattern recognition receptors“ (PRR's), bakterielle Bestandteile und reagieren darauf mit einer Zytokinproduktion, welche die akute Entzündung auslöst. Polymorphkernige, neutrophile und basophile Granulozyten sowie Makrophagen, wandern ein und bekämpfen den eingedrungenen Erreger [67,68]. Die Erreger werden phagozytiert, deren Antigene prozessiert und für die spezifischen Immunzellen, wie B- und T-Lymphozyten, präsentiert [69]. Auch das zum angeborenen Immunsystem gehörende Komplementsystem wird aktiviert um die eingedrungenen Erreger zu opsonieren oder direkt zu lysieren. Zum Zeitpunkt der Dissemination kommt es zu einer massiven Zytokinbildung durch die Immunzellen, welche mit den häufig auftretenden unspezifischen Symptomen wie Fieber, Myalgien, Abgeschlagenheit und Arthralgien einhergeht.

Die spezifische Immunabwehr, überschneidet sich in den ersten Schritten der Erregerbekämpfung mit der Angeborenen. Sie beginnt mit dem Erkennen von unspezifischen Antigenen durch die PRR's. Dabei kommt es vorwiegend zur Interaktion von „Toll like Rezeptoren“ (TLR's), genauer dem TLR2, mit bestimmten Lipoproteinen der Borrelien. Aber es sind auch weitere Rezeptorarten wie CD14 oder „Scavenger-Rezeptoren“ involviert [61,70]. Neben einer folgenden Zytokinproduktion, wandern die dendritischen Zellen nach Antigenaufnahme in die regionalen

Lymphknoten und initiieren dort die spezifische Immunantwort. Im Frühstadium erfolgt zunächst die T-Zell-Antwort. CD4 positive T-Helferzellen werden aktiviert und differenzieren sich zu TH1, TH2, TH17 oder regulatorischen T-Zellen [70,71]. Die B-Zell-Antwort läuft erst später während den nächsten Krankheitswochen ab. Die spezifische T-Zell-Antwort wird insbesondere durch das Flagellenprotein und OspA induziert [72].

Für die humorale Immunantwort des spezifischen Immunsystems, sind die B-Zellen zuständig. Sie werden mit Hilfe von TH2-Zellen und follikulär dendritischen Zellen in den Lymphfollikeln aktiviert. Ihre Aufgabe ist es als Plasmazelle spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* zu produzieren [69]. Wie bei vielen anderen Infektionen, werden auch bei der Lyme Borreliose zunächst IgM-Antikörper gebildet. In der Regel steigen die IgM-Antikörper innerhalb von zwei bis vier Wochen post infectionem an, um zwischen der sechsten und achten Woche ihr Maximum zu erreichen [73,74]. Die IgG-Antikörper steigen erst um die achte Woche an und persistieren über Jahre oder Jahrzehnte. Die Interpretation der IgM-Antwort in Hinblick auf das Infektionsstadium sollte bei einer Borrelieninfektion mit Vorsicht geschehen, da diese ebenfalls jahrelang persistieren können und deshalb keineswegs ein sicheres Zeichen einer frischen Infektion sind [74]. Die ersten Antikörper, die gebildet werden, richten sich gegen das 41 KDa Flagellenprotein. Später auch gegen weitere Epitope wie OspA und OspB [75]. Je länger der Krankheitsverlauf andauert, desto mehr unterschiedliche Antikörper sind im Western-Blot als Banden nachweisbar [76].

1.3.4 Immunevasion

Borrelia verfügt über verschiedene Strategien, um innerhalb eines immunkompetenten Wirts langfristig zu überleben. Während der Vermehrung und Verbreitung im Wirt ist *Borrelia* in der Lage, sich den verschiedenen Abwehrmechanismen des wirtseigenen Immunsystems weitgehend zu entziehen. Die Strategien von *Borrelia* sind dabei z.B. Antigenvariation (durch genetische Umbauvorgänge, Mutationen, Rekombination und variable Antigenexpression), physikalische Abschottungsmechanismen (Bildung von zystischen Formen, Verdecken besonders immunogener Strukturen) und letztlich auch aktiver Immunsuppression. Die aktive Immunsuppression beinhaltet unter anderem die

Hemmung des Komplementsystems oder die Induktion von antiinflammatorischen Zytokinen [41]. Wie die Flexibilität des Genoms und die Variabilität der Proteinexpression zu der großen Vielfalt an Antigenstrukturen führen, wurde weiter oben bereits für das VlsE-Protein beschrieben. Während des Saugaktes der Zecke, nutzt *Borrelia* deren Speichel für ihre Immunevasion. *Borrelia* bindet in der Speicheldrüse, über OspC, an ein Speichelprotein (Salp15) der Zecke. Dieser OspC-Salp15-Komplex, schützt *Borrelia* im neuen Wirt vor einer Antikörperbindung [77].

Auch gegen die Angriffe des wirtseigenen Komplementsystems besitzt *Borrelia burgdorferi* eine Strategie. Das Komplementsystem kann hauptsächlich über drei Wege aktiviert werden. Klassisch, via Antigen-Antikörper-Komplex, alternativ über C3b und über den Lektinweg. Letztendlich kommt es nach Aktivierung zu einem kaskadenartigen Ablauf verschiedener Proteinspaltungen und Initiierung eines sogenannten Membrane Attack Complexes (MAC), mit nachfolgender Lyse des Erregers. Insbesondere der alternative Aktivierungsweg wird durch *B. burgdorferi* gehemmt. Der Erreger exprimiert bis zu fünf verschiedene, sogenannte CRASP's (Complement regulator acquiring surface proteins). Diese CRASP's, binden zwei wichtige Komplementregulatoren des alternativen Wegs: Faktor H und Faktor H like Protein 1 (FHL1). Diese Proteine, befinden sich konstitutiv im Plasma des Wirtes und verhindern eine Komplementaktivierung über C3b an wirtseigenen Zellen. Durch Bindung dieser Regulatorproteine an der Borrelienoberfläche kann dort angelagertes C3b inaktiviert werden und der Erreger entgeht dadurch der Lyse [64,78,79]. Auch die Lokalisation von *Borrelia* in bestimmten Geweben scheint für die langfristige Persistenz wichtig zu sein. Das Zurückziehen in bradytrophes Gewebe, Verstecken in tiefen Zellinvaginationen und eventuell sogar intrazelluläre Persistenz trägt dazu bei [79]. In vitro konnte *B. burgdorferi* die Bindung an Fibrozyten mit enger Anlagerung in tiefen Zellfalten nachgewiesen werden, wo sie nicht phagozytiert wurden [80]. In Zellkulturexperimenten konnte eine intrazelluläre Persistenz in Synovialzellen über mindestens acht Wochen nachgewiesen werden. Zugabe von Ceftriaxon zur Zellkultur erfasste extrazelluläre Borrelien, während nach Kultur des Zelllysates wieder Borrelien isoliert werden konnten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine intrazelluläre Persistenz zur Immunevasion und Therapieresistenz beiträgt [81]. Da aber ein intrazellulärer Nachweis im Patientenmaterial bisher nur sehr selten erbracht und *Borrelia* häufiger extrazellulär

in verschiedenen Geweben nachgewiesen wurde, muss man davon ausgehen, dass eine intrazelluläre Persistenz selten ist [79].

Eine weitere Möglichkeit der langen Überlebensdauer von *Borrelia* könnte Quorum sensing und Biofilmbildung sein. Quorum sensing ist eine Art Kommunikationsmechanismus unter Bakterien. Bestimmte Signalmoleküle, sogenannte Autoinduktoren (AI1 – AI3), werden von Bakterien produziert. Steigt die Konzentration der Signalmoleküle auf ein bestimmtes Level an, bedeutet dies eine hohe Zelldichte und die Bakterien ändern daraufhin, aufeinander abgestimmt, ihre Genexpression. Der Sinn des Quorum sensing ist es, Prozesse wie z.B. Biofilmbildung zu koordinieren, welche nicht effizient genug wären, wenn sie von einzelnen Bakterien durchgeführt werden [82]. Biofilmbildung ist ein Mechanismus von Bakterien, sich vor dem Immunsystem und Antibiotikatherapie zu schützen. Die Bakterien organisieren sich dabei in einer, aus komplexen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bestehender, Schleimschicht. Bei *B. burgdorferi* konnte das LuxS-Enzym nachgewiesen werden, welches für die Synthese von Autoinduktor 2 notwendig ist [83]. Ob *Borrelia* diese Enzymausstattung für eine Biofilmorganisation oder für die Synthese anderer Proteine nutzt, ist jedoch noch unklar. Allerdings zeigen Untersuchungen, dass *Borrelia* in vitro in der Lage ist Biofilm zu bilden [84].

1.3.5 Klinische Manifestationen und Verläufe

Da die Lyme Borreliose eine Multisystemerkrankung ist, sind die klinischen Manifestationen entsprechend variabel. Im Stadium der Erregerdissemination ist es theoretisch möglich, dass alle Organe befallen werden. Allerdings gibt es bestimmte Prädispositionsstellen wie Haut, Nervensystem, Gelenke und Herz [85]. Traditionell wird die Erkrankung in drei Stadien eingeteilt. Das erste Stadium der lokalen Infektion, das zweite Stadium der Dissemination und das dritte Stadium der Persistenz. Dies hat hauptsächlich didaktische Vorteile, denn tatsächlich kann man den stadienhaften Verlauf der Erkrankung nur selten gut nachvollziehen. Mitunter, weil die ersten Beschwerden erst im späteren Krankheitsverlauf auftreten. Sinnvoller erscheint deshalb die Einteilung in eine akute und chronische Verlaufsform [2,66,86].

Kutane Frühmanifestationen:

Erythema migrans (Wanderröte): Es tritt nach einer Inkubationszeit von ca. zwei Wochen an der Stelle des Zeckenstiches auf und ist die häufigste Manifestationsform

der Lyme Borreliose. Von der Einstichstelle ausgehend, breitet sich im typischen Fall ein randbetontes Erythem aus. Das Zentrum kann dabei abblassen, wodurch es schließlich ringförmig erscheint. Häufig ist das Aussehen aber nicht klinisch eindeutig. Besonders, wenn der Durchmesser noch kleiner als fünf Zentimeter ist, kann es als homogenes Erythem oder randbetont, mit zentraler livider Verfärbung auftreten [66,85]. Auch papulöse, sowie vesiculöse Hauterscheinungen wurden beschrieben [87]. Nach der Erregerdissemination in der Haut, kann es auch als multilokuläre Form, mit mehreren Läsionen über den Körper verteilt, auftreten. Für die Lokalisation gibt es zwar bestimmte Prädilektionsstellen, wie die Poplitealregion und die Leistenengegend, es kann aber letztlich am gesamten Körper in Erscheinung treten [85]. Ungefähr die Hälfte der europäischen Patienten klagen über lokale Symptome wie Juckreiz, Brennen oder Schmerzen und 20 bis 51% der Patienten geben Begleitsymptome wie Müdigkeit, Unwohlsein, Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen an. Fieber ist in Europa eher selten ($< 5\%$), während in Nordamerika 16% der Betroffenen Fieber entwickeln [66,88]. Das Erythema migrans heilt normalerweise selbständig, innerhalb einiger Wochen, ab. Es sollte aber, um eine Dissemination und mögliche Chronifizierung zu vermeiden, antibiotisch behandelt werden [89,90].

Lymphadenosis cutis benigna (Borrelien-Lymphozytom): Beim Borrelien-Lymphozytom, handelt es sich um ein gutartiges und rückbildungsfähiges Pseudolymphom. Klinisch stellt es sich durch eine knotige, rötlich-livide verfärbte, prall-elastische Schwellung der Haut dar. Prädilektionsstellen sind die Ohr läppchen, die Mammillenregion und der Genitalbereich. In den meisten Fällen sind Kinder betroffen. Die Hauterscheinung bleibt unbehandelt länger bestehen als das Erythema migrans, häufig über mehrere Monate. Histologisch zeigen sich lymphozytäre Infiltrate neben Plasmazellen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten. Liegen mitotisch aktive Lymphozyten in Keimzentren vor, kann die Abgrenzung zu malignen Lymphozyten schwer sein [85,91].

Kutane Spätmanifestation:

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA): Die Acrodermatitis chronica atrophicans wird hauptsächlich in Europa gefunden. Dank der frühen Antibiotikatherapie tritt sie heute nur noch selten auf. Sie entsteht schon im Verlauf der Dissemination oder erst Jahre später. Klinisch treten zunächst diffuse, fleckige, leicht livide Rötungen meistens an Hand- oder Fußrücken auf. Meist ist nur eine Extremität betroffen. Auch

Schwellungen im Bereich der Hautrötungen kommen vor. Über Wochen bis Monate zeigen sich vermehrt Zeichen der Atrophie. Das Unterhautfettgewebe nimmt ab, die Haut wird dünn und die Fältelung nimmt zu. Durch die pergamentartig dünne Haut, werden die Gefäßzeichnungen immer deutlicher erkennbar. Die Acrodermatitis chronica atrophicans hat keine Selbstheilungstendenz. Es lassen sich, auch nach langem Verlauf, noch Borrelien im betroffenen Gewebe nachweisen [17,92].

Neuroborreliose:

Das Nervensystem ist, neben der Haut, eine weitere Prädispositionsstelle bei einer Infektion mit *B. burgdorferi*. In 10 bis 15% der manifesten Borreliose ist das Nervensystem beteiligt [93]. Dabei gibt es auch hier verschiedene Affektionen und demnach unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder. Aufgrund der Symptombdauer bzw. dem Zeitpunkt des Auftretens, kann man die akute von der chronischen Neuroborreliose abgrenzen.

Meningopolyradikuloneuritis (Bannwarth-Syndrom): Eine Form der akut verlaufenden Neuroborreliose und mitunter die häufigste Affektion des Nervensystems beim Erwachsenen, ist das schmerzhaftes Bannwarth-Syndrom. Kinder scheinen dabei häufiger eine isoliert meningitische Verlaufsform zu entwickeln [94]. Die Symptome der Radikulitis treten im Mittel vier bis sechs Wochen nach dem Zeckenstich auf. Dabei handelt es sich um überwiegend nächtlich auftretende, wandernde, radikuläre Schmerzen an Extremitäten und Rumpf, die auf die üblichen Analgetika kaum ansprechen. Auch Paresen der peripheren Nerven sind beschrieben [94]. Bei 60% der Patienten treten Hirnnervenausfälle auf. Am häufigsten ist dabei der N. facialis betroffen. In 40% der Fälle treten bilaterale Facialisparesen auf [17]. Außerdem findet sich ein entzündliches Liquorsyndrom mit lymphomonozytärer Pleozytose, Eiweißerhöhung und oligoklonalen IgG-Banden. Der Liquor/Serum Quotient für Albumin ist erhöht und es lässt sich eine intrathekale IgG oder IgM-Synthese gegen *B. burgdorferi* nachweisen [85]. Ohne antibiotische Therapie kann sich der Verlauf zwischen Monaten und 1,5 Jahren bewegen. Die Symptome können sich dabei episodenhaft bessern und wieder verschlechtern [94].

Zu den chronischen neurologischen Manifestationen, welche auch noch Jahre nach der Infektion auftreten können, zählen: die chronisch progrediente Borrelien-Enzephalitis/Enzephalomyelitis, die zerebrale Vaskulitis und die ACA assoziierte Polyneuropathie [85].

Chronisch progrediente Borrelien-Enzephalitis: Spezifische Symptome weist die Erkrankung nicht auf, weshalb die Anamnese einer vorliegenden Borreliose, bei entsprechender klinisch-neurologischer Symptomatik und Antikörpernachweis im Liquor für die Diagnosestellung essentiell ist. Zum Symptomenspektrum zählen: Bewusstseinsstörungen, fokale und generalisierte Anfälle, para- oder tetraspastische Syndrome, Hemianopsien, Aphasien, Ataxien, Blasenentleerungsstörungen und andere [17,85].

Zerebrale Vaskulitis: Dieses seltener auftretende Krankheitsbild verläuft nach einem längeren, uncharakteristischen Prodromalstadium mit Müdigkeit und Unwohlsein, plötzlich akut. Durch die von *B. burgdorferi* induzierte Perivaskulitis kann es zu Verschlüssen größerer und kleinerer Gefäße kommen. Es folgen ischämische oder hämorrhagische Komplikationen. Diese zeigen sich von der akuten Hemiparese, über einfache Kopfschmerzen oder sensible Defizite klinisch variabel [95–97].

ACA assoziierte Polyneuropathie: Bei 40 bis 60% der Patienten mit Acrodermatitis chronica atrophicans, entwickelt sich zusätzlich eine periphere asymmetrische Polyneuropathie mit Kribbelparästhesien und nächtlichen Schmerzen [17,85,98].

Lyme Karditis:

Mit weniger als 5% ist die Lyme Karditis eine seltene Manifestationsform der Borreliose. Möglicherweise wird sie aber einfach zu selten bemerkt, da eine Herzbeteiligung häufig subklinisch oder mit unspezifischen Symptomen verläuft [17]. Wenn manifest, zeigt sie sich als Leitungs- oder Rhythmusstörung, Perikarditis sowie Endomyokarditis. Am häufigsten sind dabei fluktuierende AV-Blockierungen verschiedenen Grades, bis hin zum totalen AV-Block mit der Notwendigkeit eines passageren Schrittmachers [99,100]. Die kardialen Manifestationen bilden sich normalerweise selbständig zurück. Persistente Rhythmusstörungen sind eher selten [85].

Lyme Arthritis:

Bereits wenige Wochen nach der Infektion, treten häufig rheumatologische Symptome wie Arthralgien oder Myalgien auf. Die Lyme Arthritis im engeren Sinne, manifestiert sich allerdings erst mehrere Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich. In der Regel tritt sie als Mono- oder Oligoarthritis in Erscheinung, wobei in 85% der Fälle nur ein Kniegelenk betroffen ist. Eine Affektion der kleinen Fingergelenke, wie etwa bei der Polyarthritis, kommt selten vor [17]. Häufig treten auch Kniegelenksergüsse und Poplitealzysten auf. Die Synovialanalyse ist nicht

charakteristisch. Es zeigt sich eine erhöhte Zellzahl, mit überwiegend neutrophilen Granulozyten. Auch die histologische Untersuchung der Synovialmembran zeigt keine spezifischen Veränderungen. Der Verlauf ist in der Regel episodisch, mit unterschiedlich langen Schüben und symptomfreien Intervallen. In den meisten Fällen hat die Lyme Arthritis eine gute Prognose und heilt spontan ab. Eine antibiotische Therapie kann dabei den Heilungsverlauf verkürzen. Chronische Verläufe kommen in 10% der Fälle vor [85].

1.3.6 Therapie

Wird die Lyme Borreliose rechtzeitig adäquat antibiotisch behandelt, ist die Prognose relativ gut. Der Krankheitsverlauf wird dadurch verkürzt und Neumanifestationen verhindert. Defektheilungen sind selten, außer bei bereits bestehender Atrophie der Haut im Rahmen der ACA [85].

1.3.7 Prophylaxe und Prävention

Die beste prophylaktische Maßnahme gegen die Lyme Borreliose ist die Vermeidung von Zeckenstichen. Durch entsprechendes Verhalten in den Endemiegebieten, wie geschlossene Kleidung und dem Meiden hoher Gräser sowie Unterholz, ist es möglich, die Wahrscheinlichkeit eines Stiches zu reduzieren. Insektenschutzmittel zeigen bei Zecken nur bedingte Wirksamkeit. Durch die verzögerte Übertragung der Borrelien ist auch das schnelle Entfernen der Zecke, sollte es zu einem Stich gekommen sein, eine wichtige Maßnahme. Aktuell ist eine Impfung gegen die Erkrankung nicht verfügbar. Ein vor einigen Jahren in den USA bereits kommerziell vertriebener Impfstoff, wurde wegen gesundheitlicher Bedenken wieder eingezogen [101].

1.4 Diagnostik der Lyme Borreliose

1.4.1 Direkte Nachweismethoden

Standardnachweis einer bakteriellen Infektion ist in der Regel der kulturelle Erregernachweis. Da *B. burgdorferi* aber ein sehr anspruchsvoller Keim ist, dauert die kulturelle Diagnostik häufig lange und ist aufwendig. Deshalb hat sich die PCR als direkte Nachweismethode durchgesetzt. Besonders für die Diagnostik aus

Hautbiopsien und Synovia ist die PCR mit einer Sensitivität von bis zu 80% gut geeignet [17,102,103].

1.4.2 Serologie

Beim klassischen Verlauf der Lyme Borreliose, mit den typischen Hautmanifestationen, kann und sollte die Diagnose klinisch gestellt werden. Verläufe wie die Neuroborreliose oder die Lyme-Arthritis, sind hingegen ohne erinnerlichen Zeckenstich oder Erythema migrans, nicht einfach zu diagnostizieren. Hier kann eine serologische Diagnostik, mit Nachweis spezifischer Antikörper gegen *B. burgdorferi*, hilfreich sein.

Empfohlen ist die Serologie als Stufendiagnostik durchzuführen. Hierbei wird zunächst ein weniger aufwendiger Suchtest für IgG oder IgM-Antikörper durchgeführt. In der Regel handelt es sich dabei um einen Immunoassay mit hoher Sensitivität, meistens ein ELISA (enzyme linked immuno assay). Ein positiver Testausfall muss mittels spezifischerem Immunoblot bestätigt werden (vgl. Abb. 1.6). Zusätzlich kann durch die unterschiedliche Antigenauftragung das Antikörperspektrum untersucht und so eine Aussage zum Infektionsstadium gemacht werden. Je länger das Krankheitsgeschehen besteht, desto breiter ist in der Regel das Antikörperspektrum [85,103–105]. Auch das Oberflächenantigen VlsE wird im Immunoblot zum Nachweis spezifischer Antikörper genutzt. Die Antikörper werden dabei hauptsächlich gegen die IR6 und bestimmte, ebenfalls invariable, membrannahe Regionen an den N- und C-terminalen Enden des Proteins gebildet. Die Immunantwort gegen letztere Epitope scheinen dabei erst später im Krankheitsverlauf aufzutreten, als Antikörper gegen IR6. Die gebildeten Antikörper können auf intakten Borrelien aber nicht binden, da die Epitope von invariablen Regionen abgeschirmt werden, weshalb sie letztlich keine immunologische Schutzfunktion hervorrufen [46,48,50,106]. Da die humorale Immunantwort nicht immer den von anderen Infektionskrankheiten gewohnten Ablauf folgt, ist bei der Interpretation der Ergebnisse Vorsicht geboten. Liegt ein Erythema migrans vor, kann die initiale Immunantwort sogar fehlen [107]. Eine IgM-Antwort tritt einerseits nicht in allen akuten Fällen auf und kann andererseits in späten Krankheitsphasen langfristig persistieren. Beim typischen Verlauf erfolgt etwa ab der dritten Woche eine IgM-Antwort, welche nach weiteren drei Wochen von einer IgG-Bildung ergänzt wird

[104,105]. Falsch positive IgM-Nachweise kommen vor und können durch eine oligoklonale Stimulation, aufgrund anderer Infektionen (z.B. EBV) oder Autoimmunerkrankungen, bedingt sein [17]. Im Spätstadium hat die Serologie einen sehr guten negativ prädiktiven Wert, weshalb bei einem negativen Befund eine Lyme-Borreliose zu nahezu 99% ausgeschlossen werden kann [85,103].

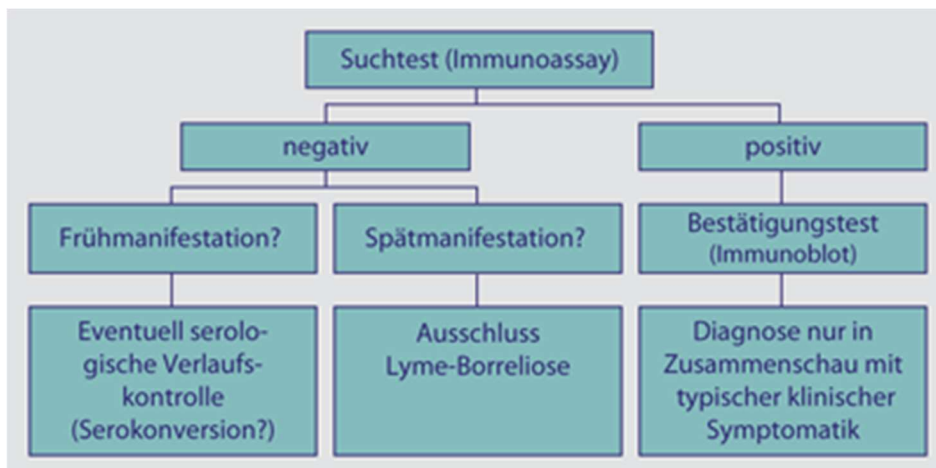


Abbildung 1.6: Diagnostischer Algorithmus der Borrelien-Serologie [85]

1.4.3 T-Zell basierte Testsysteme

Die Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Antwort wäre für die Diagnostik insofern attraktiv, weil sie bereits vor einer Antikörperproduktion positiv ausfallen müsste. In der Routinediagnostik sind Nachweise auf T-Zell-Ebene allerdings noch nicht etabliert. Bisherige Studien zeigen kontroverse Resultate. Der Lymphoproliferationsassay, zeigt einerseits signifikante Antworten bei Patienten mit Hautmanifestationen, andererseits reagierten auch die T-Zellen gesunder Patienten auf Antigene von *B. burgdorferi* [108–110]. Eine relativ neue Methode, um spezifische T-Zellen nachzuweisen, ist der Elispot (Enzyme linked immunospot assay). Der bereits routinemäßig in der Tuberkulosediagnostik eingesetzte Test basiert auf der spezifischen Aktivierung der Zellen in vitro mit nachfolgender Detektion der produzierten Zytokine. Für den Einsatz in der diagnostischen Routine gibt es bei der Borreliose aufgrund der geringen Studienlage und Standardisierung noch keine Empfehlung [103].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Diagnose einer klinisch untypisch oder chronisch verlaufenden Lyme Borreliose, wird unter Einbeziehung der serologischen Diagnostik, also mittels Antikörpernachweis im 2-Stufen-Test, gestellt. Doch die Serologie stellt mit einer geringen Sensitivität von 20 bis 50% im Frühstadium kein optimales Testsystem dar [107]. Im Stadium der frühen Dissemination steigt die Sensitivität zwar auf 70-90% und bei einer akuten Neuroborreliose sogar auf 100% an, was einem guten negativ prädiktiven Wert entspricht, allerdings geschieht dies zu Lasten der Spezifität [103,111]. Je unspezifischer die Symptome, umso geringer ist der positiv prädiktive Wert der Serologie. Die Serokonversion in der gesunden Bevölkerung, welche von Alter und Häufigkeit des Aufenthaltes im Zeckenhabitat abhängt, liegt bei 5 - 20% [103]. Das Problem der IgM-Antwort wurde bereits erläutert. IgM-Antikörper können bei der Lyme Borreliose lange persistieren und sprechen daher nicht in jedem Fall für eine akute Infektion. Diese Befunde weisen darauf hin, dass eine weitere Nachweismethode neben der Serologie, zur Diagnosestellung und Abschätzung der Krankheitsaktivität, nützlich wäre. Die Diagnostik auf T-Zell-Ebene könnte sich als entsprechende Zusatzmethode eignen. Dazu gab es bereits verschiedene Versuche, doch die falsch positiven Raten sind bisher noch hoch. Das könnte jedoch am Einsatz ungenügend aufgearbeiteter Antigene, wie beispielsweise Borrelienganzzelllysate, liegen, welches wahrscheinlich unspezifische Mitogene und Aktivatoren für T-Zellen enthält [112]. Ziel dieser Arbeit ist es, rekombinante Antigene für die Etablierung eines Elispots herzustellen. Mit der Elispot Technik ist es möglich die spezifische T-Zell-Antwort in der Einzelzellebene in Größe und Qualität zu beschreiben. Auch eine geringe Anzahl reaktiver T-Zellen kann mit der Elispottechnologie nachgewiesen werden. Die Sensitivität ist 20 bis 200 mal höher, als die Flowzytometrie mit intrazellulärer Färbung [113,114]. In einer Studie des Instituts wurden Vergleichstestungen von Elispot und konventioneller Serologie, an 52 Probanden unter Einsatz verschiedener rekombinant hergestellter Antigene der Firma Microgen im Elispot, durchgeführt. Hier konnte das Oberflächenprotein VlsE als geeignetes Antigen detektiert werden. Kleinere Bestandteile dieses Antigens sollen laborintern rekombinant hergestellt werden. Die Proteinherstellung kann mit verschiedenen Verfahren erfolgen. In dieser Arbeit werden HEK-293T-Säugetierzellen und Sf9-Insektenzellen verwendet. Das VlsE Oberflächenantigen wird hierbei in vier einzelnen kleineren Bestandteilen produziert, um in

weiterführenden Tests, deren immunogenen Bereiche bestimmen zu können. Die selektive Auswahl eines möglichst kleinen antigenen Bereiches hat zum Ziel die Spezifität des Testes zu verbessern.

2 Material

2.1 Geräte

Absaugeinrichtung	Vaccubrand MEZC, Wertheim, Deutschland
Agarosegelkammer	H. Hölzel, Dorfen, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific Heracell 150, Braunschweig, Deutschland
Cell Viability Analyzer	Beckmann Coulter Vi-CELL XR, Krefeld, Deutschland
ELISA-Prozessor	Siemens Healthcare BEP III, Erlangen, Deutschland
ELISA-Reader	BioRad Microplatereader 680, München Deutschland
Elispot-Reader	AID, Robotic Elispot/Fluoro Spot Reader, Strassberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Keyence Biorevo BZ9000, Neu-Isenburg, Deutschland
Geldokumentation	BioRad GelDoc XR, München, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica Mikrosystems DM750, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR 3001K, Schwabach, Deutschland

Material

Netzgeräte	BioRad PowerPac basic, München, Deutschland
	BioRad PowerPac 200, München, Deutschland
Orbital Shaker	Grant bio PTR-30, Cambridgeshire, UK
Pipetten	Gilson Pipetman (2 µl – 1000 µl), Middleton, USA
	Integra Biosciences Pipetboy acu, Konstanz, Deutschland
Plattenmikroskop	Hund Wetzlar Wiloverts, Wetzlar, Deutschland
Plattformschüttler	Heidolph Promax 2020, Schwabach, Deutschland
Schüttler	Vortex Genie2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Spektrometer	NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland
Sterilbank	BDK UVF 6.12S, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermocycler	PTC 200, MJ Research, St. Bruno, Kanada Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Deutschland

Material

Ultraschallsonifizierer	Sonifier 450, Branson, Danbury, USA
Wägeapparatur	Sartorius BP3100P, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL 1003, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer	Neubauer (Tiefe: 0,100mm; Fläche 0,0025mm ²)
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 3 S-R, Hanau, Deutschland Hettich Rotixa 50RS, Tuttlingen, Deutschland Uniequipe Microliterzentrifuge, Planegg, Deutschland Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

96 Well MultiScreen PVDF-Platten	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
96-well maxisorb Elisa Platten	Nunc, SigmaAldrich, München, Deutschland
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette, 7,5ml LH, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland S-Monovette, 7,5ml Z, Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Cryotubes	CryoTube Vials, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Disposable Scalpell Standard No.22	Feather Safety Razor, Osaka, Japan

Material

Leucosep-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Serva, 71224, Heidelberg, Deutschland
PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (10/20/200/1000µl)	Peqlab safeguard, VWR, Erlangen, Deutschland
Polystyrenröhrchen 5ml	Corning, Falcon, Tewksbury, USA
Reaktionsgefäße 1,5ml	Greiner bio-one, Frickenhausen Deutschland
Rotilabo Spritzenfilter 0,45µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipetten (2/5/10/25ml)	Greiner bio-one Cellstar, Frickenhausen Deutschland
Tubes 15ml konisch	BD, Falcon, Heidelberg, Deutschland
Tubes 15ml konisch	Greiner bio-one, Cellstar Tubes, Frickenhausen, Deutschland
Tubes 50ml konisch	BD, Falcon, Heidelberg, Deutschland
Tubes 50ml konisch	Greiner bio-one, Cellstar Tubes, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75cm ²	Corning, Falcon, Tewksbury, USA
Zellkulturflaschen 175cm ²	Corning, Falcon, Tewksbury, USA
Zellkulturplatten 6 Well a 34,8mm	Corning, Costar, Tewksbury, USA

Zellkulturschalen 100x20mm	Corning, Falcon, Tewksbury, USA
----------------------------	---------------------------------

2.3 Chemikalien

Acrylamidmix 4K	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
-----------------	---

AgNO ₃	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
-------------------	---

Anti-Flag-Affinity-Agarose	Bioutil, Absource Diagnostics, Deutschland
----------------------------	--

APS	Ammoniumperoxodisulfat, Honeywell, Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
-----	--

BSK-H-Medium	Sigma-Aldrich, München Deutschland
--------------	------------------------------------

CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
-------------------	-------------------------------

DMSO	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
------	-------------------------------------

Essigsäure	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
------------	---

Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
---------	-------------------------------------

Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
---------------------------	-------------------------------------

Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, München, Deutschland
-------------------	-------------------------------------

Formaldehyd 37%	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
-----------------	---

Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
----------	-------------------------------------

Material

Glycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
HCl	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Phosphatpuffer Dulbecco	Sigma Aldrich, München, Deutschland
PMA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ionomycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Proteinmarker	V7709 Prestained Proteinmarker, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Reinstwasser:	Academic, MilliQ Reinstwasseranlage
SDS	Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine: Sigma Aldrich, München, Deutschland

Material

TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethane, Santa Clara, USA	Affymetrix,
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	
Wasser (Molekularbiologie)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	

2.4 Nährmedien für die Zellkultur

AIM-V-Medium	Gibco, LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
DMEM	Gibco, LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640	Gibco LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland
TC100	Gibco LifeTechnologies, Darmstadt, Deutschland

2.5 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemische Methoden

5xProbenpuffer für SDS-Gel-Elektrophorese:	0,4g Tris 0,5g SDS 2,5ml β -Mercaptoethanol 1ml 25mM EDTA 3ml Glycerin 87% Spatelspitze Bromthymolblau Mit HCl 25% auf pH 6,8 titrieren, H ₂ O ad 10ml
Blocking Puffer:	5% Magermilch in TBS
Blotting Puffer:	25 mM Tris /pH 7,5 200 mM Glycin

Material

	20% Methanol (techn.)
PBS-Puffer (1l):	8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat
SDS-Laufpuffer:	25mM Tris, 0192 M Glycin, 0,1%SDS
TBS Puffer:	20mM Tris/pH 7,5 0,5 M NaCl
TTBS Puffer:	20mM Tris/pH 7,5 0,5 M NaCl 0,05% Tween 20
TPBS-Puffer:	PBS; 0,5% Tween
Färbelösung Coomassie-Kang:	0,02% CBB-G250 (B-0770, CAS-Nr. 6104-58-1, Sigma Aldrich, München, Deutschland) 5% Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat (227617, CAS-Nr. 7784-31-8, Sigma Aldrich, München, Deutschland)
Entfärber Coomassie-Kang:	10%EtOH (96%), Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland 2% ortho-Phosphorsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

2.6 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

1kB-DNA-Ladder	N3232S New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
50 bp DNA-Ladder	Gene Ruler 50 bp, Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, Deutschland
2xHBS-Puffer:	für 500ml 8,2g NaCl 0,13gNa ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 5,95g HEPES pH 7,13
Agarose	11404, Serva, Heidelberg, Deutschland
DNA-Probenpuffer	0,25% [w/v] Orange G, Sigma Aldrich, Deutschland 40% [w/v] Saccharose, Sigma Aldrich, Deutschland gelöst in 6x TAE-Puffer
Ethidiumbromid	46047, Sigma Aldrich, München. Deutschland
LB-Medium	Hefextrakt 5g/l Trypton 10g/l
LB/Ampicillin-Agar	analog LB-Medium Agar 15g/l Ampicillin 100µg/ml

Material

Ligationspuffer	T4 DNA-Ligase Buffer, B69, Life Technologies, Deutschland
Restriktionspuffer	TANGO (10x), BY5, LifeTechnologies, Deutschland
S.O.C-Medium	Sigma Aldrich, München, Deutschland
TFBI (pH 5,8)	30mM KAc 100mM RbCl 50mM MnCl ₂ 10mM CaCl ₂ 15% Glycerin (v/v) pH mit 25%iger Essigsäure titrieren
TFBII (pH 6,5)	10mM MOPS 75mM CaCl ₂ 10mM RbCl 15% Glycerin (v/v) pH mit NaOH titrieren
TAE-Puffer	40mM TRIS 20mM Essigsäure 1mM EDTA
Wasser für die Molekularbiologie	Aqua, Braun, Melsungen, Deutschland

2.7 Plasmide, Bakterienstämme:

Klonierungsvektoren	pMA-T, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland pMA, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
---------------------	--

Material

pMK-RX-Bb, Life Technologies,
Darmstadt, Deutschland

pFastBac1, Life Technologies,
Darmstadt, Deutschland

Expressionsvektor

pCR.3, Invitrogen, Darmstadt,
Deutschland

Bakterienstämme

E. coli DH5 α , hauseigener Stamm E.
coli DH10Bac, Life Technologies,
Darmstadt, Deutschland

2.8 Enzyme:

Restriktionsenzyme:

XhoI

ER 0691, Thermo Scientific,
Braunschweig, Deutschland

XbaI

ER 00685, Thermo Scientific,
Braunschweig, Deutschland

EcoRI

ER 1271, Thermo Scientific,
Braunschweig, Deutschland

Weitere Enzyme:

DNA-Ligase

T4 DNA Ligase, EL0011, Thermo
Scientific, Braunschweig,
Deutschland

Taq-Polymerase

AmpliTaq Gold DNA-Polymerase,
N8080243, Thermo Scientific,
Braunschweig, Deutschland

2.9 Oligonukleotide:

Name des Primers	Sequenz
BacVlse1 Forward	5'- TTATGAATTCACCATGATCACCAACAGCCGG-3'
bacVlse1 Reverse	5'- TTATTCTAGATTATCACTTATCGTCGTCG-3'
bacVlse2 Forward	5'-TTATGAATTCACCATGGAAGGCGTGAAGTTCGCC-3'
bacVlse2 Reverse	5'- TTATTCTAGATTATCACTTATCGTCGTCG-3
bacVlse3 Forward	5'-TTATGAATTCACCATGGACACCTTCTTCAAGAGCGA-3'
bacVlse3 Reverse	5'-TTATTCTAGATTATCACTTGTCGTCGTC-3'
bacVlse4 Forward	5'-TTATGAATTCACCATGGTGTCCATCGTGGATGCC-3'
bacVlse4 Reverse	5'-TTATTCTAGATTATCACTTGTCGTCGTC-3'
pUC/M13 Forward	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 Reverse	5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'

Bezug der Oligonukleotide:

Thermo Scientific, Braunschweig,
Deutschland

2.10 Antikörper, Konjugate:

Anti-Flag-Antikörper:

Monoclonal ANTI-FLAG M2, Clone
M2, CatNr F3165, Sigma Aldrich,
München, Deutschland

Material

Anti-Mouse-HRP	Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP Code-Nr. P 0260, Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Mouse IgG Biotin	Goat Anti-Mouse IgG-Biotin, Code 3825-6-25, Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Streptavidin- ALP	Code 3310-8, Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Anti-human INF- γ	Anti human INF- γ mAB 1D1K Code: 3420-3-250, Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Anti-human INF- γ Biotin	Anti human INF- γ mAB 7-B6-1 BiotinCode: 3420-6-250, Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Anti-human-IgG/HRP	Recomline, Mikrogen, Neuried, Deutschland

2.11 Substrate

ALP-Substrat-Färbelösung:	1-Step NBT/BCIP Prod# 34042 Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
HRP Substrat WB:	recomBlot, TMB-Substrat, Mikrogen, Neuried, Deutschland
HRP Substrat ELISA:	OptEIA, BD, Heidelberg, Deutschland

2.12 Borrelienantigene

Bereitgestellt von der Firma Mikrogen, Neuried, Deutschland:

Antigen	Charge	Konzentration
<i>B. spielmanii</i> p18 pSig	4912	4,25 mg/ml
<i>B. afzelii</i> OspA pKo	5112	0,48 mg/ml
<i>B. burgdorferi s.s.</i> OspC B31	3912	3,58 mg/ml
<i>B. garinii</i> OspC 20047S	4412	1,60 mg/ml
<i>B. afzelii</i> OspC pKo	4012	4,68 mg/ml
<i>B. burgdorferi s.s.</i> p18 pKa	4912	4,20 mg/ml
<i>B. bavariensis, garinii</i> p18 pBi	4912	3,65 mg/ml
<i>B. afzelii</i> p18 pKo	4312	4,35 mg/ml
<i>B. garinii</i> p18 20047	4912	4,60 mg/ml
<i>B. bavariensis, garinii, afzelii</i> Vlse pBi pKo	4512	1,15 mg/ml
<i>B. afzelii</i> p100 pKo	5112	1,74 mg/ml

2.13 Kommerziell erhältliche Kits

Borrelia burgdorferi ELISA

Enzygnost, Lyme link VlsE/IgG,
Siemens Healthcare, Erlangen,
Deutschland
Enzygnost, Borreliosis IgM

	Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland
Borrelia burgdorferi Westernblot	recomLine Borrelia IgG/IgM, Mikrogen, Neuried, Deutschland
Plasmidreinigung	Qiaprep Spin Miniprep, Quiagen, Hilden, Deutschland
DNA-Gel-Extraktion	Quiaquick Gel Extraction Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland
Transfektionskit	Effectene Transfection Reagent, Quiagen, Hilden, Deutschland

2.14 Zelllinien

2.14.1 HEK293T-Zellen (*Human embryonic kidney*)

Diese adhärent wachsende Zelllinie ist ein Transformationsprodukt aus menschlichen Nierenzellen mit Adenovirus-5-DNA. Sie enthalten das SV40 large T-Antigen, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit einem „SV40 origin of replication“ ermöglicht. Dies macht diese Zelllinie besonders geeignet für eine Transfektion mit nachfolgender Proteinexpression.

Die Zellen werden als Aliquot, in FCS und 10% DMSO mit einer Zellzahl von 5×10^6 /ml, in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.14.2 Sf9-Insektenzellen

Sf9 ist eine immortalisierte, adhärent oder in Suspension wachsende Zelllinie, aus Ovarialzellen der Nachtfalterart *Spodoptera frugiperda*. Die Sf9-Zellen sind sehr robust und relativ unempfindlich gegen Scherstress. Sie wachsen gut in serumfreien Medium, deshalb eignen sie sich gut zur rekombinanten Herstellung von Proteinen. Die Zellen werden als Aliquot, in FCS und 10% DMSO mit einer Zellzahl von 5×10^6 /ml, in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

2.15 Software und Datenbanken

Datenbanken:	Pubmed/NCBI (National Center for Biotechnology Information) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Daten- und Bildbearbeitung:	Adobe Photoshop Microsoft Office IBM SPSS Statistiksoftware
Online-Software:	Protein Calculator v3.4 http://protcalc.sourceforge.net/
Primerdesign:	Primer3 http://simgene.com/Primer3

3 Methoden

3.1 Probandenkollektiv

Nach Genehmigung der Untersuchung durch die Ethikkommission der Universität Regensburg wurden 52 gesunde Probanden in die, im Vorfeld durchgeführte, Studie eingeschlossen. Bei den Probanden handelt es sich um männliche und weibliche Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene. Der Altersdurchschnitt beträgt 39 Jahre.

3.2 Einschlusskriterien

- Mindestalter von 18 Jahren
- Vorliegende schriftliche Einwilligungserklärung des Probanden oder seines rechtlichen Vertreters

3.3 Ausschlusskriterien

- Alter < 18 Jahre

- Fehlende schriftliche Einwilligungserklärung des Teilnehmers oder seines rechtlichen Vertreters
- HIV-Positivität
- Akute oder chronische Hepatitis
- Proband leidet unter einer unkontrollierten Infektion oder einer anderen instabilen Begleiterkrankung
- Beim Probanden liegt eine Form von Drogenmissbrauch oder eine andere schwerwiegende psychische Störung vor, die dem Informationsaustausch zwischen Prüfer und Proband beeinträchtigen könnte

3.4 Probengewinnung

Die Blutentnahme wurde unter standardisierten Bedingungen, im Impfraum des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg, durchgeführt. Dies ermöglichte eine zeitnahe Weiterverarbeitung der Proben. Es wurden 2 x 7,5 ml venöses Blut in Lithium-Heparin-Röhrchen und 1 x 7,5 ml Serumröhrchen mittels Sarstedt s-Monovette-System entnommen.

Die Abnahme erfolgte am Tag 0 und am Tag 48±14.

3.5 Probenaufarbeitung

3.5.1 Gewinnung von PBMC nach Leucosep-Methode

Zur Vorbereitung der Leucosep-Röhrchen wurden je 3 ml Ficoll-Paque Plus auf die enthaltene Fritte gegeben und 1 Minute bei 350 RCF (g) und Raumtemperatur (18 - 25°C) zentrifugiert.

Die LiH-Röhrchen wurden für die Plasmagewinnung zunächst für 10 Minuten bei 100 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abnahme des Plasmas wurde mit AIM-V Medium wieder auf ein Volumen von 8 ml aufgefüllt und homogenisiert. Das so verdünnte Blut wurde pro Patient in 2 vorbereitete Leucosep Röhrchen übertragen.



Abbildung 3.1: Leucosep-Röhrchen vor Zentrifugation (Fa. Oxford Immunotec)

Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 RCM (g) für 10 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Bremse. Die PBMC's finden sich nach der Zentrifugation als wolkige Schicht auf dem Ficoll.

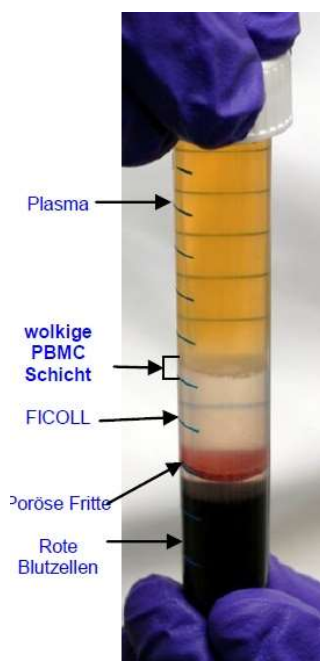


Abbildung 3.2: Nach Zentrifugation finden sich die PBMC's als wolkige Schicht auf dem Ficoll (Fa. Oxford Immunotec)

Die Zellen nahm man vorsichtig ab und pipettierte sie in ein 50 ml Spitzbodenzentrifugationsröhrchen (Falcon). Mit RPMI-1640-Medium wurde auf 20 ml aufgefüllt und bei 600 RCF (g) und Raumtemperatur, für 7 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellpellet mit 1 ml RPMI-1640-Medium resuspendiert und nochmals mit RPMI-1640-Medium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 350 RCF (g) und Raumtemperatur für 7 Minuten. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes, konnte das Zellpellet mit 1 ml AIM-V-Kulturmedium resuspendiert werden.

Anschließend wurde die Zellzahl mittels Cell Viability Analyzer (Vi-CELL XR) bestimmt. Es erfolgte hierzu eine Verdünnung von 1:20. Zu 570 µl AIM-V-Medium wurden 30 µl der Zellsuspension gegeben. Für den Einsatz im Elispot ist eine Zellzahl von 200000/100 µl bzw. Well nötig. Dementsprechend wurde die Suspension anschließend verdünnt.

3.6 Serologische Untersuchungen

3.6.1 ELISA IgM/IgG

Die Serumproben wurden der Routinediagnostik des Institutes übergeben. Dort erfolgte die serologische Testung mittels Enzygnost IgG/IgM – Test und BEP III (Behring Elisa Prozessor III). Mit Hilfe des BEP III Systems erfolgt nach der Probendosierung eine automatische Testabarbeitung und Auswertung. Die Testplatten sind aus Einfachriegeln zusammengesetzt und mit Borrelienantigenen beschichtet. Der Enzygnost „Lyme link VlsE/IgG“ Test arbeitet mit einem Antigengemisch aus dem europäischen Patientenisolat B. afzelii pKo, welches eine Vielzahl diagnostisch relevanter Antigene beinhaltet. Außerdem enthält es einen Zusatz von rekombinanten VlsE dreier humanpathogener Genospezies. (B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi s.s.). Beim Enzygnost „Borreliosis/IgM“ entspricht das beschichtete Antigen einem Detergenzextrakt aus dem B. afzelii pKo Patientenisolat. Befinden sich spezifische Antikörper im Patientenserum, binden diese an die Antigene in den Reaktionsvertiefungen. Nach dem Waschen wird anti-Human IgG bzw. IgM Antikörper hinzugegeben, welcher mit Peroxidase gekoppelt ist. Der Enzymanteil des Konjugats setzt die Chromogengebrauchslösung unter Bildung einer blauen Farbe um. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet und es erfolgt ein Farbumschlag nach gelb. Die Intensität der gebildeten Farbe ist

der in der Probe enthaltenen *Borrelia*-spezifischen Antikörpern proportional und wird bei 450 nm gemessen.

3.6.2 Westernblot IgG, IgM

Falls die Probanden im ELISA-Test ein positives Ergebnis zeigten, wurde der spezifischere Westernblot als zweite Nachweismethode angeschlossen. Hierfür kam das gebrauchsfertige Testkit „recomLine *Borrelia* IgM“ und „recomLine *Borrelia* IgG“ der Firma Microgen zum Einsatz.

Alle Reagenzien sind vor Testbeginn für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (18-30°C) gebracht worden. Mit einer Pinzette wurden die Teststreifen in die Inkubationsschalen gelegt und anschließend mit 2 ml Verdünnungspuffer überschichtet. Für den IgG-Nachweis pipettierte man dem Puffer 20 µl, für den IgM-Nachweis 40 µl des Patientenserums zu. Unter vorsichtigem Schütteln wurde die Serumverdünnung (IgG 1:100; IgM 1:50) gemischt, mit einem Kunststoffdeckel abgedeckt und für eine Stunde unter leichten Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Waschen wurde der Überstand abgenommen, 2 ml gebrauchsfertiger Waschpuffer A in jede Inkubationswanne pipettiert und für 5 Minuten unter Schwenken gewaschen. Dieser Vorgang wiederholte sich insgesamt drei Mal. Nach dem Waschen wurden jeweils 2 ml Konjugatlösung zugefügt und unter leichtem Schütteln, für 45 Minuten bei Raumtemperatur, inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift, analog wie oben beschrieben. Nach dem Waschen erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Substratlösung, welche für 8 Minuten unter leichtem Schütteln inkubierte. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach Entfernung der Substratlösung durch kurzes Waschen mit deionisiertem Wasser. Anschließend wurden die Streifen lichtgeschützt für 2 Stunden auf saugfähigem Papier getrocknet und die Banden ausgewertet.

3.7 Untersuchung mittels Elispot

3.7.1 Prinzip der Elispottechnologie

Der Elispot-Test (Enzyme linked Immuno Spot Test), ermöglicht den Nachweis von sezernierten Zytokinen oder Antikörper bestimmter Immunzellen, nachdem diese durch ein zugegebenes Antigen zur Sekretion angeregt wurden. Die Sekretionsprodukte werden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern an einer Membran

fixiert und anschließend mittels eines zweiten Detektionsantikörpers, welcher enzymgekoppelt ist, nachgewiesen. In dieser Arbeit werden Interferon- γ produzierende T-Zellen nachgewiesen, welche auf bestimmte Borrelienantigene reagieren.

3.7.2 Humaner T-Zell-Elispot mit Borrelienantigenen

Das Elispot-Verfahren wurde in zwei verschiedenen Settings angewandt. Im ersten Setting, als Vergleichsmessung mit der konventionellen Serologie. Beim zweiten Experiment galt es, innerhalb der Elispottechnologie mit VlsE-Vollantigenen und rekombinant hergestellten Teilantigenen, Vergleichsmessungen durchzuführen. Im Folgenden wird der Ablauf eines Elispots beschrieben, wobei die Art des zugegebenen Antigens immer vom jeweiligen Setting abhängig ist.

In die Kavitäten einer 96 Well Multiscreen PVDF-Platte, werden 15 μ l Ethanol 35% pipettiert, um die hydrophoben Eigenschaften der Platte zu reduzieren. Im Anschluss wurde 2 x mit 200 μ l PBS (Sigma) gewaschen. Die Platte wurde mit 1:200 in PBS (Sigma) verdünnten anti-human-Interferon- γ -mAB über Nacht bei 4°C „gecoatet“. Nach dem „Coaten“ folgte sieben maliges Waschen mit 200 μ l PBS (Sigma). Die unspezifischen Bindestellen werden anschließend, durch Zugabe von 200 μ l von RPMI-Medium für 2 Stunden bei Raumtemperatur, geblockt. Es folgt erneut 7 x Waschen mit 200 μ l PBS (Sigma).

Der Antigeneinsatz weicht nun je nach Setting ab:

Für die Vergleichsmessung zwischen Serologie und Elispotverfahren, wurden folgende Antigene eingesetzt (jeweils in einer Konzentration von 2 μ g/100 μ l):

p18 pSig	OspC 20047S	VlsE pBi pKo	p18 pBi
OspA pKo	OspC pKo	p18 pKo	p100 pKo
OspC B31	p18 pKa	p18 20047	Borrelienlysat

Für die Vergleichsmessungen innerhalb der Elispot-Technologie wurden diese Antigene eingesetzt (Zielkonzentration von 2 μ g/100 μ l):

VlsE pBi pKo	VlsE1	VlsE2	VlsE3	VlsE4
--------------	-------	-------	-------	-------

Als Positivkontrolle fungierten 2 µl PMA (10ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) im Verhältnis 1:1 auf 200 µl AIMV-Medium. Für die Negativkontrolle wurde AIMV Medium verwendet. Den vorgelegten Antigenen werden nun 20 µl der präparierten PBMC's zu einer Endkonzentration von 2×10^5 Zellen/Well hinzugefügt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ für 16 – 20 Stunden. Nach dieser Inkubation wird der Zell-Antigen Ansatz abgesaugt und die Platte 7 x mit 200 µl PBS gewaschen.

Spotentwicklung:

Nach dem Waschen werden je 100 µl des biotinylierten anti-human-Interferon-γ mAB in der Verdünnung 1:1000 in PBS zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein weiterer Waschvorgang mit 7 x 200 µl PBS und im Anschluss die Zugabe von 1:1000 in PBS verdünnten Strep-AP-Konjugat, welches eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substratlösung Step-one hinzugefügt und ca. acht Minuten im Dunkeln entwickelt. Die Reaktion wird im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit deionisierten Wasser abgestoppt, die Platte abgeklopft und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Auswertung der Spots erfolgt mit dem AID Elispot Reader System.

3.8 Herstellung der Vektoren zur Expression in Säugetierzellen

3.8.1 Zielsequenzen

Eine institutsinterne Studie zeigte, dass unter den bereitgestellten Antigenen der Firma Mikrogen, das rekombinant hergestellte VlsE-pBi-pKo-Antigen die beste Immunantwort auf T-Zell-Ebene hervorrief. Das firmeneigene Protein besteht aus den VlsE-Sequenzen von *B. bavariensis* und *B. afzelii*.

Um eine Feinkartierung der T-Zell-Antwort für VlsE vorzunehmen, wurden die veröffentlichten Sequenzen von VlsE für *B. bavariensis* und *B. afzelii* verwendet.

B. bavariensis:

Accession: CAF34024

```
1 mkkissaifi vaflaligck nnvggddkkd taasifyqsi inlngnfiev fnafsglvad
61 afskadpkks dvktyfdsit ktlkdtktkl ediskektgg ektpavegia evvktvgewl
121 dglikaaegg gkaadgggsd kignvaaggg agadkesvng iagaikgive aakkvegkfk
181 apkaaadaaa adgnkkagkl fgtaagadag dvkdaaaavg avsgeqilna ivtaaggagq
241 agkkadeakn aieaaigaag dadfgddikk kndqiaaalv lrgvakdgkf aga
```

B. afzelii:

Accession: WP_014486319

```
1 mqaaddeana aagklfagna naavgdiaka asavtavsg qilkaivdaa gdqdgagaaa
61 gaatnpiaaa igdaggaaf gedmkksdki aaaivlrgva kdqkfavana nandskasvk
121 savdevskwl eemikaatea atkgggndki gdvgaanaga kadkdsvngi akqikgiva
181 agkafgkegn alkdvkeaad geanaadagkl fagnanaavg digkaagavs avsgeqilka
241 ivdaagdknq egaaagaatn pieaaigdag agatgfanag mkksdniaaa ivlrgvakdg
301 kfaaandnka svksavesav devsawlkem itaageaatk ggtggdekig dsaannagka
361 dessvkgiak gikgivaag kalgekgalk dvkeaaaagd dnkdagklfa gqngngaadv
421 agaiakaaga vsavsgeqil kaiveaagda anqegaaaaq atnpiaglrl glmimgrrl
481 rmi
```

Die beiden Sequenzen wurden, mit jeweils überlappenden Enden, in vier Teile unterteilt und eine Flag-tag-Sequenz (DYKDDDDK) hinzugefügt. Die Teilsequenzen werden nachfolgend als VlsE1 - VlsE4 bezeichnet.

Die genauen DNA- und Aminosäuresequenzen der einzelnen VlsE-Varianten befinden sich im Anhang. Es erfolgten geringfügige Modifikationen der oben genannten veröffentlichten Sequenzen.

3.8.2 Klonierungsvektoren

Durch die Firma GeneArt/Invitrogen wurden die DNA-Sequenzen mit synthetischen Oligonukleotiden und/oder PCR-Produkte hergestellt und anschließend in Plasmidvektoren eingebracht.

Plasmid-DNA mit VlsE1-Fragment:

Das synthetisch hergestellte VlsE1-Fragment wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *SfiI* in einen pMA-T-Vektor eingefügt und über den kompetenten *E. coli* Stamm K12 (dam⁺ dcm⁺ tonA) kloniert. Die Sequenzierung der gereinigten Insertions-DNA ergab 100% Übereinstimmung mit der Zielsequenz. 5 µg der Plasmidpräparation wurden lyophilisiert und unserem Labor zugesandt.

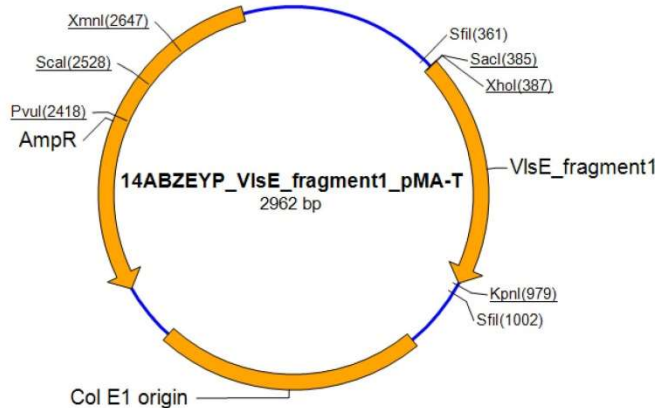


Abbildung 3.3: Vektorkarte des pMA-T-Plasmids mit VlsE1-Fragment

Plasmid-DNA mit VlsE2-Fragment:

Das synthetisch hergestellte VlsE2-Fragment wurde mit Hilfe des Restriktionsenzymen *KpnI* und *SacI*, in einen pMA-Vektor eingefügt und über den kompetenten *E. coli* Stamm K12 (dam⁺ dcm⁺ tonA) kloniert. Die Sequenzierung der gereinigten Insertions-DNA ergab 100% Übereinstimmung mit der Zielsequenz. 5 µg der Plasmidpräparation wurden lyophilisiert und unserem Labor zugesandt.

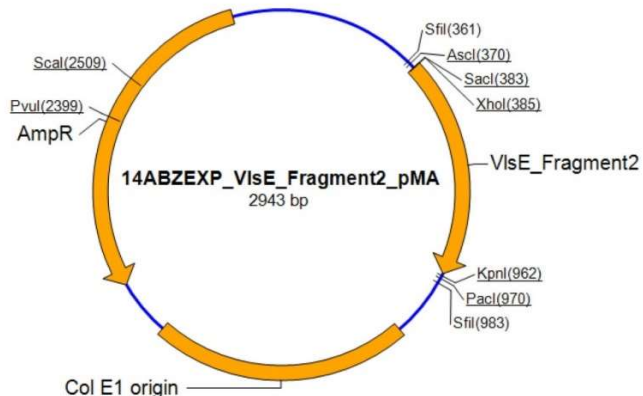


Abbildung 3.4: Vektorkarte des pMA-Plasmids mit VlsE2-Fragment

Plasmid-DNA mit VlsE3-Fragment:

Das synthetisch hergestellte VlsE3-Fragment wurde mit Hilfe des Restriktionsenzymes SfiI in einen pMA-T-Vektor eingefügt und über den kompetenten E. coli Stamm K12 (dam⁺ dcm⁺ tonA) kloniert. Die Sequenzierung der gereinigten Insertions-DNA ergab 100% Übereinstimmung mit der Zielsequenz. 5 µg der Plasmidpräparation wurden lyophilisiert und unserem Labor zugesandt.

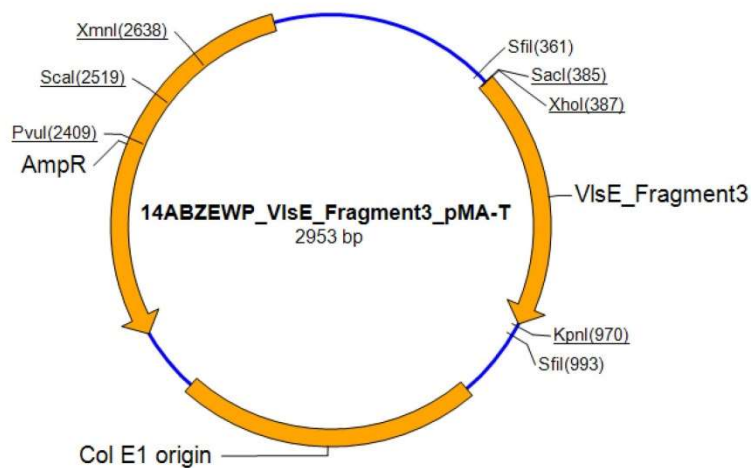


Abbildung 3.5: Vektorkarte des pMA-T-Plasmids mit VlsE3-Fragment

Plasmid-DNA mit VlsE4-Fragment:

Das synthetisch hergestellte VlsE4-Fragment wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym SfiI in einen pMK-RQ-Bb-Vektor eingefügt und über den kompetenten E. coli Stamm K12 (dam⁺ dcm⁺ tonA rec) kloniert. Die Sequenzierung der gereinigten Insertions-DNA ergab 100% Übereinstimmung mit der Zielsequenz. 5 µg der Plasmidpräparation wurden lyophilisiert und unserem Labor zugesandt.

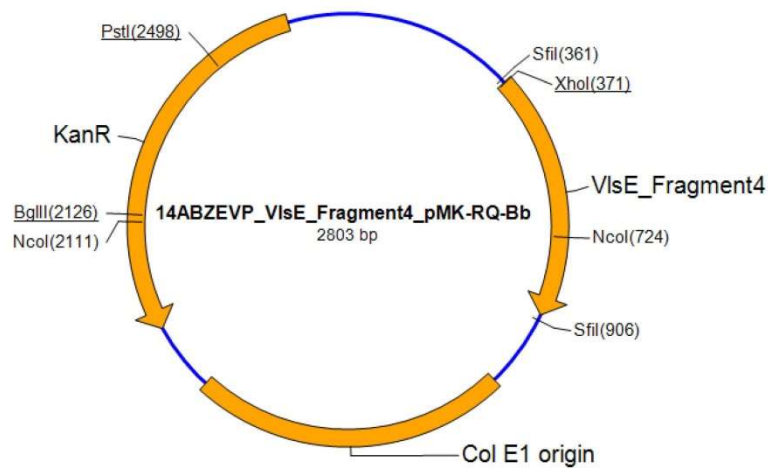


Abbildung 3.6: Vektorkarte des pMK-RQ-Bb-Plasmids mit VlsE3-Fragment

3.8.3 Plasmidverdau:

Für eine starke Proteinexpression in Säugetierzellen ist die Einbringung der Zielsequenzen in einen Vektor mit CMV-Promotor nötig. Hierfür wurden die VlsE-Fragmente aus den Klonierungsvektoren ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pCR3 eingefügt.

Folgender Ansatz wurde für den Verdau der Klonierungsplasmide pipettiert:

Komponente	Volumen
10x Buffer TANGO	10 µl
Plasmid-DNA Plasmid (0,7 µg/µl)	5 µl
XhoI	2,5 µl
XbaI	2,5 µl
H ₂ O	30 µl

Folgender Ansatz wurde für den Verdau der Expressionsplasmide pipettiert:

Komponente	Volumen
10x Buffer TANGO	10 µl
Plasmid-DNA Plasmid pCR3 (0,7 µg/µl)	7 µl
XhoI	2,5 µl
XbaI	2,5 µl
H ₂ O	28 µl

Die Inkubation erfolgte jeweils 2 Stunden bei 37°C.

3.8.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Separation der entstandenen Fragmente mit anschließender Extraktion wurden die gespaltenen Plasmide in 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Für die Anfärbung der DNA kamen 30 µl Ethidiumbromid pro Gel hinzu. Die flüssige Agaroselösung wurde anschließend in eine Gelapparatur gegossen und durch Abkühlung bei Raumtemperatur fest. 50 µl der DNA-Proben wurden mit je 10 µl 6 x Probenpuffer versetzt und neben einem 1 kB-Längenstandard auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte etwa eine Stunde bei 120 V. Die Dokumentation erfolgte mittels UV-Durchlichtschirm im GelDoc XR von BioRad. Die benötigten Gelfragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel extrahiert.

Für die benötigten Fragmente berechneten sich folgende Bandengrößen:

Expressionsvektor:	5024 Bb
Fragment VlsE1:	582 Bb
Fragment VlsE2:	567 Bb
Fragment VlsE3:	573 Bb
Fragment VlsE4:	519 Bb

3.8.5 QIAquick Gelextraktion

Die knapp ausgeschnittenen Banden wurden in 2 ml Eppendorf-Tubes gegeben und anschließend gewogen. Zu 100 mg Gelvolumen kamen je 300 µl QG-Puffer hinzu. Es folgte das Auflösen des Gels für 10 Minuten bei 50°C, wobei alle 2 Minuten gevortext wurde. Der QG-Puffer enthält einen pH-Farbindikator, da die Membran in den QIAquick-Säulchen stark pH- und salzabhängig ist. Die Pufferfarbe muss nach der Inkubation gelb sein (entspricht pH < 7,5). Anschließend wurde dem aufgelösten Gel-Puffergemisch, pro 100 mg Gel, 100 µl Isopropanol (100%) zugefügt, um die Extraktion von Fragmenten, welche größer als 4 Kb sind zu verbessern. Die QIAquick-Säulchen wurden in 2 ml Collection-Tubes platziert, die Proben auf die Säulen aufgetragen und eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen zurück in das Collection-Tube gestellt. Um restliche Agarose zu entfernen wurde 2 x 0,5 ml QG-Puffer zugegeben und abzentrifugiert. Zum Waschen wurden 0,75 ml PE-Puffer einpipettiert, fünf Minuten bei RT inkubiert und anschließend wieder für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses folgte abermals für ein Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 13000 rpm. Die QIAquick-Säule wird nun in ein steriles, 1,5 ml Eppendorf-Tube gestellt, zur Elution 30 µl EB-Puffer hinzugegeben und für fünf Minuten bei 47°C inkubiert. Anschließend wurde die extrahierte DNA durch Zentrifugation (1 Min, 13000 rpm) in das sterile Eppendorf-Tube aufgefangen.

3.8.6 Ligation

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxylende der DNA.

Die DNA-Proben wurden nach der Extraktion im Nanodrop vermessen. Für die Ligation wurde die zu verwendende Menge an Insert anhand folgender Formel berechnet, da die Insert DNA gegenüber dem Vektor im Überschuss vorliegen sollte:

$$\frac{Vector [ng] * Insert [kb]}{Vector [kb]} * 7(insert):1(vector) = insert [ng]$$

Der Ligationsansatz beinhaltet den Vektor pCR3, das jeweilige VlsE-Insert aus der Gelextraktion, steriles Wasser für die Molekularbiologie, 2 x Ligationspuffer und

Quick-T4-DNA-Ligase, welche dem Ansatz zum Schluss, nach Mischen der restlichen Komponenten hinzu pipettiert wurde. Nach Zugabe der Ligase wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, kurz anzentrifugiert und für fünf Minuten bei 25°C inkubiert.

3.8.7 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass die Zellmembran der Bakterien durch CaCl_2 durchlässig gemacht wird und dadurch Plasmidvektoren aufgenommen werden können. Zur Herstellung werden 3 ml LB-Medium mit einer Öse Bakterien (*E. coli* DH5 α) beimpft und bei 37°C und 230 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden 300 ml neues LB-Medium mit der Vorkultur beimpft und bei 37°C und 230 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde anschließend bei 4000 rpm und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert, das Pellet mit 22 ml vorgekühltem TFBII-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet mit 5,4 ml vorgekühlten TFBII-Puffer resuspendiert und weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend konnte die Suspension auf Eis in Eppendorf-Tubes aliquotiert und bei – 80°C eingefroren werden.

3.8.8 Transformation

Für die Transformation wurden die hergestellten chemisch kompetenten DH5 α -Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu je 100 μl kompetenten Zellen kamen 10 μl Ligationsansatz hinzu. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis, mit anschließendem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Die Proben wurden für weitere zwei Minuten auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde in vorbereitete Polypropylenröhrchen mit 900 μl LB-Medium überführt und 1,5 Stunden bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend konnten jeweils 100 μl auf LB/Ampicillin-Agarplatten pipettiert und ausplattiert werden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Durch das Ampicillin-Resistenzgen, welches im transformierten Vektor vorliegt, ist es nur den Bakterien die DNA aufgenommen haben möglich, auf dem antibiotikahaltigen Medium zu wachsen.

3.8.9 Plasmidpräparation mit QIAprep Spin Miniprep

Bei dieser Methode werden die Bakterienzellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Die freigesetzte Plasmid-DNA bindet an das Säulenmaterial und kann so von der chromosomalen Bakterien-DNA und anderen Zellresten getrennt werden.

Für die Plasmidpräparation wurden jeweils 4 ml LB/Amp-Flüssigmedium mit den transformierten Bakterien beimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Nach Abfüllung in 2 ml Eppendorf-Tubes folgt eine Zentrifugation bei 6800 x g für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Das Pellet wird mit 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach vollständiger Lösung des Pellets, werden 250 µl P2-Puffer hinzugegeben und durch Invertieren gemischt, bis die Lösung klar wird. Nach Zugabe von 350 µl N3 folgt weiteres Mischen durch sechsmaliges Invertieren. Die Lösung wird anschließend bei 13000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand auf die QIAprep spin columns pipettiert. Nach einer Zentrifugation bei 13000 rpm für 45 Sekunden, wird der Durchfluss verworfen, auf die Säule 500 µl PB-Puffer pipettiert und wieder analog zentrifugiert. Nachdem auch dieser Durchfluss verworfen wurde, kamen 750 µl PE-Puffer hinzu und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule 60 Sekunden bei 13000 rpm trocken zentrifugiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube gestellt. Es wurden je 50 µl EB-Puffer auf die Spin-columns pipettiert und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 60 Sekunden. Hierbei sammelt sich die extrahierte DNA im Eppendorf-Tube.

3.9 Proteinexpression in Säugetierzellen

3.9.1 Zellkultur eukaryotischer Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank/Sterilbank durchgeführt. Es kamen nur sterile Materialien und Reagenzien zum Einsatz, welche für die Zellkultur als geeignet ausgezeichnet waren.

Für die rekombinante Herstellung der Borrelienproteine verwendete man HEK-293T-Zellen. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS, 100µl/ml Streptomycin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 2 mM L-Glutamin oder in einer 1:2 Mischung von DMEM (wie beschrieben) und AIMV, gehalten. Um das im FCS enthaltene

Komplementsystem zu inaktivieren, erhitze man es 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad. Die Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Je nach Bewuchs wurde entsprechend passagiert. Die Ablösung erfolgte mechanisch, durch Abspülen des Zelllayers mittels Pipette. Nach Vereinzelung durch Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension konnten die Zellen entsprechend in neue Flaschen pipettiert und mit frischem DMEM bzw. DMEM/AIMV auf ca. 20 ml aufgefüllt werden. Die Kulturbedingungen betrugen 37°C, bei einer 5 %igen CO₂-Spannung unter Wasserdampfsättigung.

3.9.2 Cryokonservierung der 293T-Zellen

Nach mechanischem Ablösen der Zellen werden diese in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Suspension wird bei 300 g für acht Minuten zentrifugiert und das Pellet mit entsprechender Menge FKS 90% und DMSO 10% so aufgenommen, dass eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml vorliegt. Davon wird je ein Milliliter in „CryoTubes“ überführt. Diese werden in Einfrierbehälter gestellt, welcher mit technischem Isopropanol befüllt ist um eine Abkühlung von 1°C pro Minute zu gewährleisten. Die Zellen werden zunächst 24 Stunden bei – 80°C gefroren. Anschließend werden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

3.9.3 Auftauen der 293T-Zellen

Das Gefäß mit den Zellen wird zügig im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension anschließend in 20 ml vorgewärmten DMEM überführt. Nach vorsichtigem Schwenken wird durch Zentrifugation für acht Minuten bei 300 g gewaschen. Das Zellpellet wird in DMEM aufgenommen und auf die Zellkulturflaschen aufgeteilt.

3.9.4 Transfektion

Um die Vektoren mit der DNA-Sequenz der rekombinant herzustellenden Proteine in eukaryotische Zellen einzuschleusen, nutzt man deren Fähigkeit Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren. Die zu übertragende DNA präzipitiert sich in einem Gemisch von Natriumphosphat und Calciumchlorid, an ausfallende Calciumphosphatkristalle.

Für die Transfektion der 293T-Zellen wurden diese für jedes Zielprotein in je eine 10 cm Gewebekulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert. Pro Schale wurden $1,8 \times 10^6$ Zellen eingebracht. Am nächsten Tag erfolgte 30 Minuten vor Transfektion ein Mediumwechsel mit 10 ml DMEM (10% FCS, 100Einheiten/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin) bzw. DMEM/AIMV.

Der Transfektionsansatz wurde ebenfalls unter der Sterilbank hergestellt. Hierbei werden zunächst je 500 µl 2x-HBS-Konzentrat (Hepes buffered saline) in Kurzhöhrchen vorgelegt. In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden jeweils 15 µg DNA und 62 µl einer 2M CaCl_2 -Lösung einpipettiert und mit sterilem Reinstwasser auf 500 µl aufgefüllt. Die hergestellte DNA-Lösung wurde tropfenweise unter halbmaximalem Schütteln auf dem Vortex zu den 500 µl vorgelegten 2xHBS zugegeben und 1,5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Schale wurde anschließend je 1 ml des Transfektionsansatzes, langsam unter achtförmiger Bewegung der Kulturschale, pipettiert. Nach 14 – 15 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 erfolgt ein Mediumwechsel mit DMEM (1% FCS, 100Einheiten/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin) bzw. AIMV, um die Transfektion abzustoppen. Die Zellen wurden drei Tage kultiviert und der Überstand abgenommen, aliquotiert und den weiteren Analysen wie SDS-Gelelektrophorese und Westernblot bzw. der Proteinreinigung zugeführt. Überstand, welcher nicht sofort benötigt wurde, wurde bei - 20°C eingefroren.

3.10 Proteinexpression durch Insektenzellen

Für die Expression der VlsE-Fragmente in Insektenzellen wurde das „Bac-to-bac-Expressionssystem“ der Firma LifeTechnologies verwendet. Um die VlsE-Fragmente aus den pCR.3-Vektoren auszuschneiden und sie anschließend in den pFastBac1-Vektor einfügen zu können war es nötig, mittels PCR eine geeignete Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI einzufügen.

3.10.1 Auswahl der Primer

Um die Schnittstelle an der richtigen Position einzufügen wurden Primer ausgewählt, welche in 5'-Richtung einen Überhang mit der entsprechenden Erkennungssequenz für EcoRI tragen. Da im pCR.3-Vektor eine Schnittstelle für das Enzym XbaI vorhanden war musste hier kein Primer mit Überhang konfiguriert werden. Das

Primerdesign erfolgte mit dem Webtool „Primer3“. Die Oligonukleotide wurden durch die Firma Thermo Fischer Scientific hergestellt und als bacVlsE1 bis bacVlsE4 forward/backward benannt.

3.10.2 Durchführung der PCR und Einfügen der Schnittstelle für *EcoRI*

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden definierte Nukleinsäuresequenzen exponentiell vermehrt. Die Methode macht es möglich, gezielt bestimmte DNA-Vorlagen zu vermehren und durch die besondere Auswahl der Primer, Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzufügen. Die Methode wurde für die Präparation ligierbarer DNA-Sequenzen verwendet.

Die Primer wurden laut Angabe auf 100 µM verdünnt. Als Template fungierte der pCR.3-Vektor mit der jeweiligen VlsE-Zielfrequenz.

Der Mastermix stellt sich folgendermaßen zusammen:

Komponente	Volumen
10x Puffer	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
dNTP (100 mM)	0,5 µl
H ₂ O	36,25 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25 µl
Primer 1	2,5 µl
Primer 2	2,5 µl
Template (100 ng/µl)	1 µl

Im Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

Initialer Denaturierungsschritt: 95 °C, 5 Minuten

Denaturierung: 95 °C, 30 Sekunden

Primer-Hybridisierung: 62°C, 30 Sekunden

Elongation: 72°C, 50 Sekunden

Abschließende Elongation: 72°C, 5 Minuten

Dauerkühlung: 4 °C

3.10.3 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt. Die Darstellung erfolgte mit Ethidiumbromid. Das Verfahren der Auftrennung, Darstellung und Extraktion der DNA aus dem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraktionskit wurden oben bereits beschrieben.

3.10.4 Einfügen der VlsE-Sequenzen in den pFastBac-Vektor

Für die anschließende Klonierung der VlsE-Sequenzen in den pFastBac-Vektor, wurden die PCR-Produkte sowie der Vektor mit den Extraktionsenzymen EcoRI und XbaI verdaut.

Der Ansatz wurde folgendermaßen pipettiert und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert:

Komponente	Volumen				
10x Tango	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
pFastBacT (1,285 µg/ml)	5 µl				
PCR-Produkt VlsE1		25 µl			
PCR-Produkt VlsE2			27 µl		
PCR-Produkt VlsE3				27 µl	
PCR-Produkt VlsE4					27 µl
EcoRI	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
XbaI	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
H ₂ O	30 µl	10 µl	8 µl	8 µl	8 µl

Nach der Inkubation wurden die Ansätze im Agarosegel wie bereits beschrieben aufgetrennt, dargestellt und die DNA aus dem Gel extrahiert. Die gereinigten DNA-Fragmente, sowie der pFastBac-Vektor konnten nun der Ligationsreaktion zugeführt werden. Die Durchführung erfolgte analog wie bereits beschrieben. Anschließend wurde die Ligationsreaktion in DH5 α -Zellen transformiert und die nach Klonierung erhaltenen Plasmide mittels „Qiaprep Spin Miniprep“ extrahiert. Durch einen Verdau der erhaltenen DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI, sowie anschließender Agarosegelelektrophorese konnte die Ligation nochmals geprüft werden.

3.10.5 Transformation und Transposition

Die kompetenten DH10Bac-Zellen werden auf Eis aufgetaut und je 100 μ l in ein 15 ml Rundbodenröhrchen pipettiert. Zu jedem Ansatz wurde 1 ng rekombinantes Donorplasmid hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden, bei 42°C im Wasserbad. Es folgte eine zweiminütige Abkühlung auf Eis, bevor jeweils 900 μ l S.O.C.-Medium zugegeben wurden. Diese Mischung inkubierte schwenkend, für vier Stunden bei 37°C. 100 μ l verschiedener Verdünnungsstufen wurden anschließend auf Luria-Agar ausplattiert und 48 Stunden bei 37°C bebrütet. Die Abgrenzung der Zellen, welche die rekombinante Bacmid-DNA enthalten, erfolgt über eine blau-weiß Selektion. Nur weiße Kolonien beinhalten das gewünschte Bacmid.

3.10.6 Isolation der rekombinanten Bacmid-DNA

Es wurden weiße Kolonien selektioniert, zur Verifikation des Phänotyps nochmals auf Luria-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine weiße Einzelkolonie wurde in 2 ml LB-Medium mit Kanamycin, Gentamicin und Tetrazyklin abgeimpft und schwenkend 24 Stunden bei 37°C bebrütet. 1,5 ml der Flüssigkultur überführte man in ein 1,5 ml Mikrotube und zentrifugierte es bei 13000 rpm für eine Minute. Der Überstand wurde abgenommen, erneut 1,5 ml der Kultur zugegeben und nochmals zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde jedes Pellet mit 300 μ l Lösung P1 des „Qiaprep Spin-Mini-Prep“-Kits resuspendiert. Anschließend wurde der Suspension 300 μ l Lösung P2 hinzugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss kamen 300 μ l der Lösung P3 zum Ansatz

hinzu. Es wurde weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Den Überstand überführte man in ein vorbereitetes Eppendorf-Tube mit 650 µl Isopropanol und invertierte einige Male. Nach 30 Minuten Zentrifugation konnte der Überstand verworfen, 500 µl 70%iger Ethanol hinzugegeben, einige Male invertiert und zehn Minuten zentrifugiert werden. Dann wurde so viel Überstand wie möglich abgenommen und das Pellet getrocknet, bevor es in 30 µl Reinstwasser resuspendiert wurde.

3.10.7 PCR zur Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA

Um zu prüfen, ob die Zielgene tatsächlich in der rekombinanten Bacmid-DNA vorhanden sind, wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden pUC/M13 Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet, welche die mini-Tn7-Attachementsite der Bacmid-DNA flankieren in welcher das Zielgen vorliegen soll. Geprüft wurden daher verschiedene weiße Kolonien des DH10Bac von Luria-Agar, durch Einmischen einer Pipettenspitze Koloniematerial in den PCR-Mix.

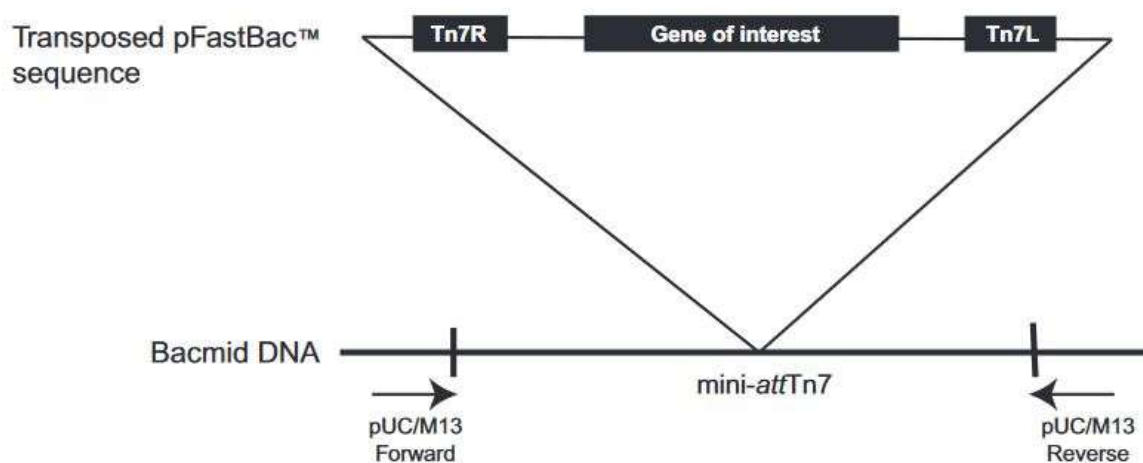


Abbildung 3.7: Nachweis des Zielgens in der rekombinanten Bacmid-DNA [115]

Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Komponente	20µl Ansatz
10x Puffer	2µl
MgCl	0,8 µl

dNTP	0,2µl
H ₂ O	14,5µl
Taq-Polymerase	0,1µl
M13fwd (10µM)	1µl
M13rev (10µM)	1µl
Weißer Kolonie	Pipettenspitze

Im Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

Initialer Denaturierungsschritt: 95 °C, 5 Minuten
 Denaturierung: 95 °C, 45 Sekunden
 Primer-Hybridisierung: 62°C, 45 Sekunden
 Elongation: 72°C, 3,5 Minuten
 Abschließende Elongation: 72°C, 10 Minuten
 Dauerkühlung: 4 °C

3.10.8 Zellkultur von Insektenzellen

Die Insektenzellen Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) wurden in Zellkulturflaschen bei 28°C kultiviert. Als Medium diente TC100 mit Zusatz von 10 % FKS, 1% Penicillin sowie Streptomycin. Zur Passage wurden die Zellen mechanisch vom Untergrund gelöst, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und mit frischem Medium in neue Flaschen umgesetzt.

3.10.9 Kryokonservierung der Sf9-Zellen

Zur längerfristigen Lagerung der Sf9-Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von circa 80 % eingefroren. Dies erfolgte über mechanische Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche und Resuspension im Kulturmedium. Nach Zentrifugation mit 380 g für 10 Minuten wurden die Zellen mit FCS und 10% DMSO so aufgenommen, dass eine Zellzahl von $5 \times 10^6/\text{ml}$ vorlag. Die Zellen wurden als 1-ml-Aliquots in Cryo-Tubes überführt. Zunächst erfolgte für 24 Stunden eine langsame Abkühlung in mit

Isopropanol gefüllten Einfrierbehältern auf - 80°C, bevor sie im Anschluss in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.10.10 Auftauen der Sf9-Zellen

Das Gefäß mit den Zellen wird zügig im 28°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension anschließend in 20 ml vorgewärmten TC100 Medium überführt. Nach vorsichtigem Schwenken wird durch Zentrifugation für acht Minuten bei 300 g gewaschen. Das Zellpellet wird in TC100 aufgenommen und auf die Zellkulturflaschen aufgeteilt.

3.10.11 Transfektion der Zellen mit Bacmid DNA

Die Transfektion der Sf9-Zellen mit Bacmid-DNA erfolgte mit dem „Effectene Transfektionskit“ der Firma Qiagen. Das Prinzip beruht hierbei auf einem nicht liposomalen Lipid. In Anwesenheit des Condensing-Enhancers und unter standardisierten Pufferbedingungen wird die DNA zunächst stark kondensiert. Nach Zugabe des Effectene-Reagenzes bildet die kondensierte DNA damit Komplexe. Im wässrigen Zellkulturmedium formieren sich diese Komplexe spontan zu Mizellen, welche anschließend durch die Lipidschicht der Zelle aufgenommen werden können. Für die Transfektion wurden jeweils 9×10^5 Zellen, in 1,4 ml TC100 Medium mit Penicillin und Streptomycin, in 35-mm-Vertiefungen ausgesät. Damit sich die Zellen am Untergrund anhaften können, wurde zunächst zwei Stunden bei 28°C inkubiert.

Vorbereitung des Transfektionsgemisches mit dem Qiagen Transfektionskit:

0,8 µg Bacmid-DNA werden in 100 µl EC-Puffer pipettiert, anschließend 6,4 µl Enhancer zugegeben, gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Effectene, folgt nach gründlichem Mischen erneut eine Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Dem Ansatz werden anschließend 600 µl TC100 hinzupipettiert und durch zweimaliges Auf- und Abziehen der Pipette gemischt.

Das Transfektionsgemisch wird nun gleichmäßig unter Schwenken der Platte auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgt für drei bis sechs Tage bei 28°C, unter Beobachtung der Transfektionseffizienz unter dem Plattenmikroskop. Eine ausreichende Transfektion zeigt sich durch Merkmale der Virusreplikation wie Zellvergrößerung, Zellkernvergrößerung und Ablösung der Zellen.

3.10.12 Virusernte und Aufbewahrung

Der Überstand der transfizierten Zellen wurde abgenommen, fünf Minuten bei 500 g zentrifugiert, der neue Überstand in ein frisches Röhrchen überführt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

3.10.13 Genexpression in Insektenzellen

In 175 cm² Zellkulturflaschen wurden $17,5 \times 10^6$ Sf9-Zellen ausgesät und zwei Stunden bei 28°C inkubiert, um die Anheftung der Zellen zu ermöglichen. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurden 2,5 ml Baculovirussuspension mit 7,5 ml TC100-Medium gemischt und der Zellkultur zugegeben. Bei einer Stunde Inkubation unter gelegentlichem Schwenken erfolgt dabei die Infektion der Insektenzellen mit den Baculoviren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 15 ml TC100-Medium mit 10% FCS und Penicillin, sowie Streptomycin in die Flaschen einpipettiert. Nach 96 Stunden konnten die Überstände abgenommen, bei 500 g für fünf Minuten zentrifugiert und den proteinchemischen Analysen zum Nachweis zugeführt werden.

3.11 Proteinbiochemische Methoden

3.11.1 SDS-Gel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der hergestellten Proteine im Überstand der Zellen erfolgte mit der SDS-Gel-Elektrophorese. Hierzu wurden 15 %ige Trenngele mit den Maßen 9 cm x 8,5 cm mit einem Sammelgel von 5% gegossen. Die Gele wurden nach folgender Rezeptur hergestellt:

Sammelgel 5%:

Komponente	Volumen
30% AA, 0,8%BAA	0,33 ml
0,625M Tris/HCl pH8,8	0,4 ml
0,5% SDS	0,4 ml

H ₂ O bidest	0,87 ml
TEMED	2 µl
10% Ammoniumpersulfat	10 µl

Trenngel 15% (geeignet für Proteine mit 3 -100 kD):

Komponente	Volumen
30% AA, 0,8%BAA	3,0 ml
1,88M Tris/HCl pH8,8	1,2 ml
0,5% SDS	1,2 ml
H ₂ O bidest	0,6 ml
TEMED	5 µl
10% Ammoniumpersulfat	30 µl

Von jeder Probe wurden 25 µl auf das Gel geladen und sieben µl eines Proteinlängenstandards (V7709 Prestained Proteinmarker, Biolabs) mitgeführt. Die Elektrophorese wurde mit 15 mA pro Gel im SDS Elektrodenpuffer durchgeführt und gestoppt, sobald die Lauffront am unteren Gelrand angelangt war.

3.11.2 Westernblot

Im Anschluss an die SDS-Gel-Elektrophorese wurde zum Nachweis der Proteine ein Westernblot durchgeführt. Hierfür wurde das Gel ausgespannt, mithilfe eines Skalpells von den Glasplatten abgelöst und ebenso, wie die Nitrocellulosemembran, in Blottingpuffer für 2-3 Minuten eingelegt. Der Transfer erfolgte im Semidry-Blotting-Verfahren bei 200 mA für 40 Minuten.

Zu Kontrolle des Nachweisverfahrens wurde ein Dotblot von Bpi-Flag (hausintern hergestelltes Bpi-Protein mit Flag-Sequenz) aufgetragen.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen schwenkte man die Nitrocellulosemembran über Nacht, bei 4°C mit 5% Magermilch in TBS. Am nächsten Tag erfolgte zunächst ein dreimaliges Waschen für je 15 Minuten mit TTBS. Anschließend wurde für zwei Stunden mit dem 1:2500 verdünnten Primärantikörper, welcher gegen das in den hergestellten Proteinen enthaltene Flag-Peptid gerichtet ist, inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für 15 Minuten mit TBS, bevor der Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse-IgG-Biotin) in einer Verdünnung von 1:1000 für 1,5 Stunden aufgebracht wurde. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde für eine Stunde mit Streptavidin-ALP in der Verdünnung 1:1000 inkubiert. Nach abermaligen Waschen mit TBS erfolgte die Entwicklung mit der Substratlösung 1-Step NBT/BCIP, bis sich der aufgetragene Dotblot als Positivkontrolle ausreichend dunkel anfärbte.

3.11.3 Dotblot

Hierbei wird auf eine vorherige elektrophoretische Auftrennung der Proteine verzichtet. Sie dient vor allem dem schnellen, orientierenden aber trotzdem spezifischen Nachweis der rekombinant hergestellten Proteine. Auf eine Nitrozellulosemembran werden je 1 µl Probe punkt- oder strichförmig aufgetragen. Die Membran wurde nach der Auftragung 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgt das Blocken der Membran in 5 % Magermilch in TBS bei 4°C, schwenkend über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 15 Minuten in TTBS gewaschen, bevor der in TBS 1:2500 verdünnte Primärantikörper anti-Flag M2 für zwei Stunden hinzugegeben wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS, erfolgt eine Inkubation für 1,5 Stunden mit 1:1000 verdünntem Sekundärantikörper Goat-Anti-Mouse-IgG-Ak, welcher biotinyliert ist. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde Streptavidin-ALP oder Streptavidin-HRP (1:1000) für 1,5 Stunden hinzugegeben. Die Farbreaktion erfolgte nach einem weiteren Waschschrift mit dem jeweiligen Substrat (TMB oder NBT/BCIP), bis zur guten Sichtbarkeit der Dots.

3.11.4 Direkter ELISA mit anti-Flag-M2 als Detektionantikörper

Um die Proteinmenge im Zellkulturüberstand zu quantifizieren wurde ein direkter ELISA mit anti-Flag-M2 als Detektionsantikörper etabliert. Als Konzentrationsstandard fungierte ebenfalls das laborintern hergestellte Protein Bpi-

Flag. Den Konzentrationsstandard verdünnte man mit dem entsprechenden Zellkulturmedium. Alle Inkubationsschritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt. In die Kavitäten einer 96-Well-Elisa-Platte wurden 100 µl der Antigenlösung einpipettiert. Diese bestand aus den vorbereiteten Standardverdünnungen und den jeweiligen Zellkulturüberständen. Beide wurden zum Coaten 1:2 mit PBS verdünnt. Das Coating erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Platte 5 x 2 Minuten mit 200 µl PBS und 0,05% Tween gewaschen und anschließend 1,5 Stunden mit 10% FCS in PBS geblockt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 200 µl PBS für 5 x 2 Minuten. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl des 1:10000 verdünnten Detektionsantikörpers anti-Flag-M2 hinzugegeben und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 200 µl PBS wurden je 100 µl des anti-Mouse/HRP-Konjugates in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von 100 µl Opt-EIA-TMB-Substrat. Nach deutlicher Farbentwicklung erfolgte das Abstoppen mit 50 µl einer 5 N Schwefelsäure. Die Messung der Extinktionen wurde mit dem Microplatereader 680 von BioRad bei 450 nm durchgeführt.

3.11.5 Coomassiefärbung nach Kang

Zum Nachweis der Proteine im Gel wurde die Färbung nach Kang durchgeführt, welche sensitiver als die klassische Coomassiefärbung ist. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese 2 x 10 min in Reinstwasser gewaschen, um das SDS aus dem Laufpuffer zu entfernen. Auf das Gel gab man die Farblösung, bis es vollständig bedeckt war und lies es schwenkend färben. Nach 10 Minuten werden die ersten Proteinspots erkennbar und nach einer Stunde sind 80% der Proteine gefärbt. Eine Sättigung ist nach drei Stunden erreicht. Die Färbelösung wurde nach zwei Stunden abgenommen und 2 x in Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde 20 Minuten entfärbt und abermals 2 x mit Reinstwasser gewaschen.

Die Geldokumentation erfolgte mit dem Dokumentationsgerät Biorad GelDoc XR.

3.11.6 Silberfärbung

Im Vergleich zur klassischen Coomassiefärbung ist die Silberfärbung etwa 100-fach sensitiver zum Nachweis der Proteine im SDS-Gel. Nach dem Elektrophoreselauf wird das Gel kurz in Reinstwasser gewaschen und nach folgender Vorschrift gefärbt:

Arbeitsschritt	Substanz	Dauer
Fixierung	50%(v/v) Methanol 10%(v/v) Essigsäure	30 Minuten
Waschen	50% (v/v) Ethanol	10 Minuten
Waschen	10% (v/v)	10 Minuten
Blockierung	10ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung 0,2% (w/v) 80ml H_2O bidest	1 Minute
Waschen	H_2O bidest	3 x 20 Sekunden
Färbung	100ml AgNO_3 -Lösung 0,1% (w/v) 75µl Formaldehydlösung 37% (v/v)	20 Minuten
Waschen	H_2O bidest	2 x 20 Sekunden
Entwicklung	100ml Na_2CO_3 6% (w/v) 50µl Formaldehydlösung 37% (v/v)	bis zur gewünschten Bandenintensität
Stoppen/Lagerung	10%(v/v) Essigsäure	

Die Geldokumentation erfolgte mit dem Biorad GelDocXR.

3.11.7 Affinitätschromatographie mit Anti-Flag-Sepharose

Um die rekombinant hergestellten Proteine vom Kulturmedium zu reinigen wurde eine Anti-Flag-Affinitätssäule verwendet. Das Säulenmaterial besteht hierbei aus Agarosebeads, an welche monoklonale Anti-Flag-Antikörper kovalent gebunden sind. An eine Quiagen 1 ml Einwegsäule wurde ein ca. 5 cm langer Gummischlauch mit 3

mm Durchmesser angebracht. Mittels Schlauchklemme kann der Durchfluss freigegeben oder gestoppt werden.

Das Säulenmaterial wird in Glycerin bei -20°C aufbewahrt und musste vor Verwendung folgendermaßen vorbereitet werden:

500 μl Säulenmaterial wurden auf 10 ml mit TBS verdünnt und anschließend bei 900 g für 3 Minuten gekühlt zentrifugiert. Den Überstand nahm man ab und pipettierte 3 ml 0,1M Glycin/HCl mit pH 3,5 hinzu. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand sofort abgenommen, da sich bei einer zu langen Inkubation der Antikörper von den Agarosebeads ablöst. Es folgte zweimaliges Waschen mit 20 ml TBS. Der Zellkulturüberstand wird durch Zugabe von 5 M NaCl auf ungefähr 150 mM NaCl eingestellt, der pH-Wert kontrolliert und bei Bedarf auf 7,2 bis 7,8 titriert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mit den Agarosebeads versetzt und für 2 Stunden bei 4°C im Orbital-Shaker inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt eine Zentrifugation bei 900 g, für 3 Minuten. Der Überstand wurde bis auf 5 ml abgenommen und die Beads resuspendiert. Nach Spülen der Quiagensäule mit TBS konnte die Agarosebeadsuspension vorsichtig auf die Säule aufgetragen werden. Nachdem die Beads sedimentiert waren, ließ man die Flüssigkeit bis kurz über die Agarosebeads ab und wusch diese mit dem 15-fachen Volumen an TBS. Anschließend wurde zur Elution 5 ml Flag-Peptid (0,1 mg/ml) hinzugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte das fraktionierte Ablassen der Flüssigkeit. Die einzelnen Fraktionen von je 250 μl wurden in Eppendorf-Tubes aufgefangen. Zum Nachweis der Proteine wurden die einzelnen Fraktionen nach der SDS-Gelelektrophorese den Westernblotanalysen und Proteinfärbungen zugeführt.

Regeneration der Agarosebeads:

Nach Durchlauf der Flag-Peptid-Lösung erfolgte ein Waschvorgang mit dem fünffachen Beadvolumen TBS. Die Beads wurden in ein 50 ml Falcon überführt und das dreifachen Volumen Glycin/HCl 0,1M mit einem pH von 3,5 zugegeben. Die Inkubation darf nicht länger als 20 Minuten erfolgen. Nach der Zentrifugation wurde ein Waschschrift mit dem zehnfachen Volumen TBS und ein weiterer Waschschrift mit 50% Glycerol in TBS durchgeführt. Die Lagerung erfolgte anschließend in dreifachem Beadvolumen Glycerol bei -20°C .

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung der Expressionsvektoren für Säugetierzellen

4.1.1 Verdau und Auftrennung der Klonierungsvektoren

Nach dem Verdau der von der Firma LifeTechnologies/GeneArt erhaltenen Klonierungsplasmide konnten deren Fragmente in einem 1 %gen Agarosegel mit Ethidiumbromid und unter UV-Licht dargestellt werden. Die Abbildung 4.1 zeigt die aufgetrennten Vektoren. Mit Hilfe des mitgeführten DNA-Längenstandards wurde die zuvor berechnete Größe der Fragmente bestätigt.

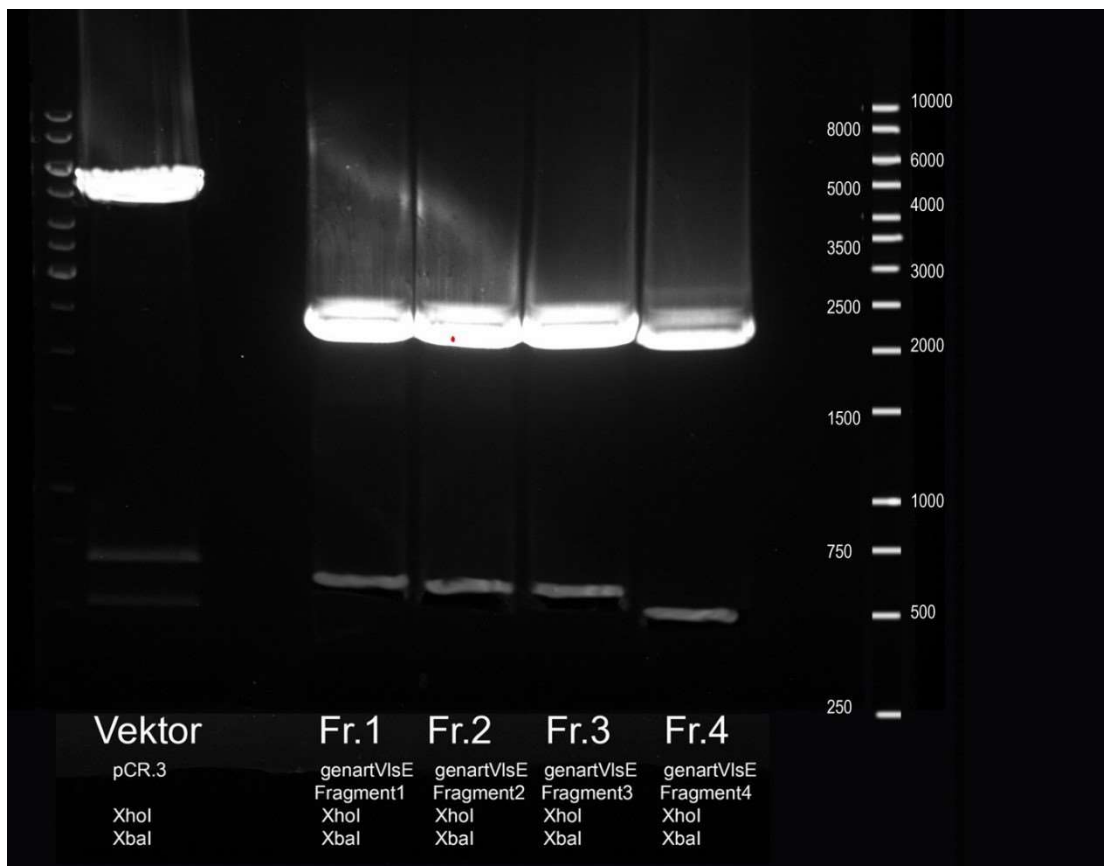


Abbildung 4.1: Die elektrophoretische Auftrennung der GeneArt-Klonierungsvektoren und dem pCR.3 Expressionsvektor nach Verdau mit XhoI und XbaI.

4.1.2 Extraktion der Vlse-Genfragmente aus dem Agarosegel

Die DNA-Fragmente wurden knapp aus dem Gel herausgeschnitten, da die Agarose die nachfolgende Ligationsreaktion negativ beeinflussen kann. Die Gelstücke wurden in 2 ml Eppendorf-Tubes gewogen und die entsprechenden Reagenzien gewichtsadaptiert eingesetzt.

Die Reinigung der Gelstücke erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben, mit dem QIAquick Gelextraktionskit. Nach der Extraktion wurden die Proben im Nanodrop vermessen:

Probe	Konzentration [ng/μl]
Vektor pCR.3	53,4
Gelstück VlsE1	32,0
Gelstück VlsE2	15,0
Gelstück VlsE3	38,4
Gelstück VlsE4	19,3

Je 50 ng der Proben wurden zur Kontrolle der Extraktion auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 4.2 zeigt die erfolgreiche Extraktion der einzelnen Gelfragmente. Die DNA-Fragmente konnten somit der Ligation zugeführt werden, welche im Methodenteil beschrieben ist.



Abbildung 4.2: Elektrophoretische Auftrennung der Proben nach der Gelextraktion. Es findet sich jeweils nur eine Bande im erwarteten Kb-Bereich.

4.1.3 Elektrophoretische Auftrennung der Expressionsvektoren nach Transformation und Klonierung

Die einzelnen Vektoren mit den jeweiligen VlsE-Inserts wurden in chemisch kompetente Bakterien transformiert und kloniert. Die Reinigung der Plasmide erfolgte mit dem QIAprep Reinigungskit, wie im Methodenteil dargestellt. Um die Klonierung zu prüfen wurden jeweils verschiedene Klone der Plasmidreinigung zugeführt. Die erhaltenen Präparate wurden im Anschluss mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI verdaut und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Abbildungen 4.3 bis 4.7 zeigen die elektrophoretische Auftrennung. Als Kontrolle der Fragmentgröße fungierte der Längenstandard.

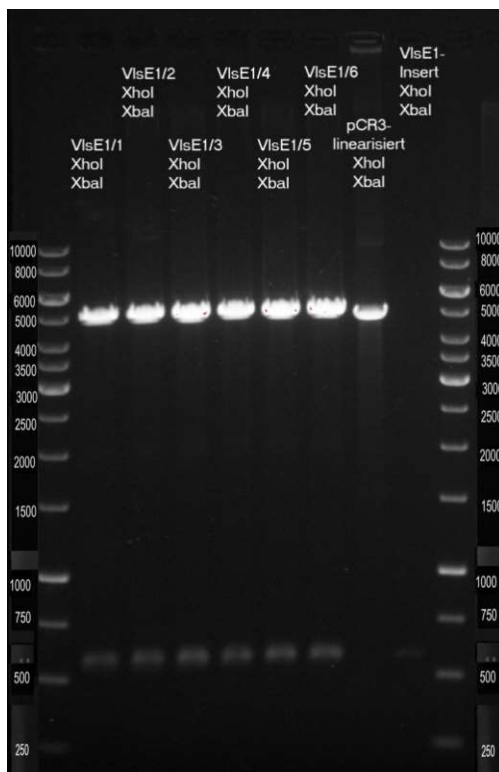


Abbildung 4.3: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE1-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.

Ergebnisse

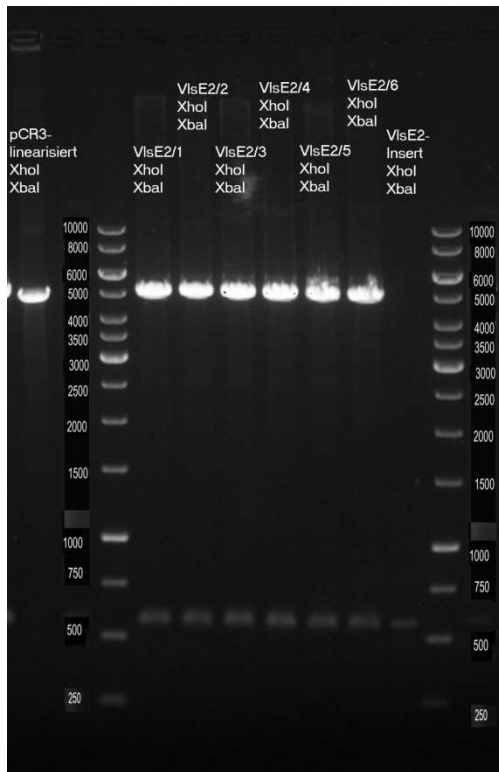


Abbildung 4.4: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE2-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.

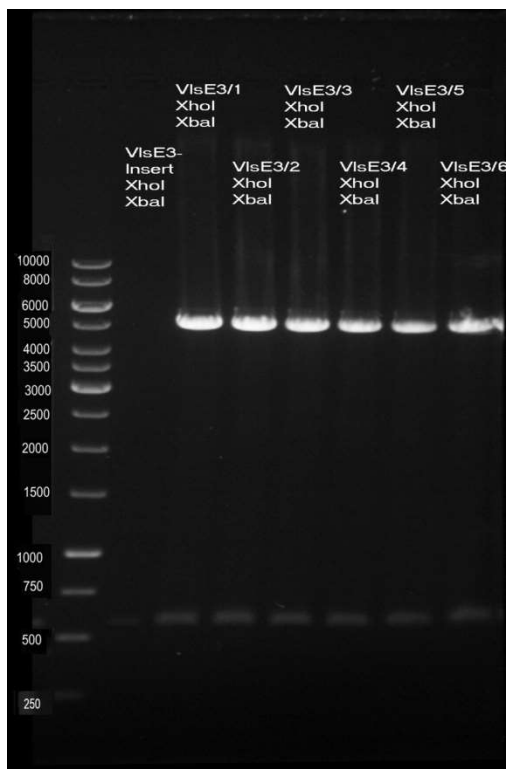


Abbildung 4.5: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE3-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.

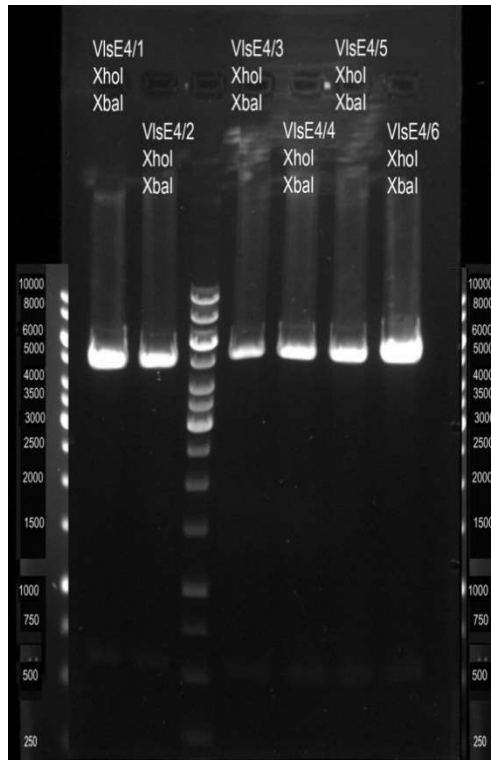


Abbildung 4.6: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE4-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.

4.2 Proteinexpression in HEK 293T Zellen

4.2.1 Experiment über die Transfektionseffizienz mit verschiedenen Nährmedien

Die bereits im Labor etablierte Transfektion der 293T-Zellen sah als Zellkulturmedium vor Transfektion, DMEM mit 10% FCS und nach Transfektion DMEM mit 1% FCS, jeweils mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin, vor. Im Verlauf weiterer Versuche mit dem Elispot-Verfahren zeigte sich jedoch eine erhöhte Spotanzahl in der DMEM-Negativkontrolle. Als Alternativmedium wurde deshalb AIMV, für weitere Vergleichstestungen und Prüfung der Signifikanz des Mediumeinflusses, herangezogen. Da die Zellen bei einem prompten Mediumwechsel von DMEM auf das serumfreie AIMV-Medium ihre Adhärenz zur Kulturflasche verloren haben wurden sie zunächst in gleichen Teilen in DMEM und AIMV gehalten und gesplittet. Hierbei behielten sie gute Adhärenz zur Zellkulturflasche. Zur Prüfung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einem für GFP codierenden Plasmid, mittels Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode, transfiziert. Zur Verifikation der Transfektion sollte das rekombinante, grün fluoreszierende Protein, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Die Abbildungen 4.7 bis 4.10 zeigen die Ergebnisse. Folgende Medien wurden verglichen:

Gehalten in	Ausgesät in	Nach Transfektion
DMEM	DMEM	DMEM
DMEM/AIMV	DMEM/AIMV	DMEM/AIMV
DMEM/AIMV	DMEM/AIMV	AIMV
DMEM/AIMV	AIMV	AIMV

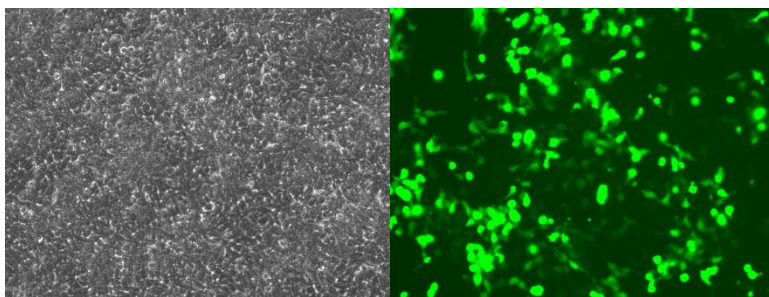


Abbildung 4.7: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in DMEM gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde DMEM als Expressionsmedium zugegeben.

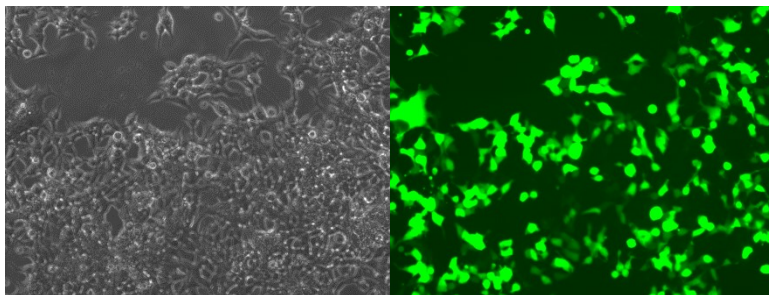


Abbildung 4.8: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in DMEM/AIMV gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde DMEM/AIMV als Expressionsmedium zugegeben.

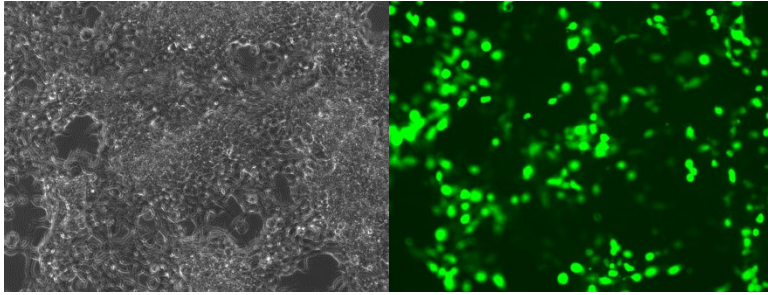


Abbildung 4.9: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in DMEM/AIMV gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde AIMV als Expressionsmedium zugegeben.

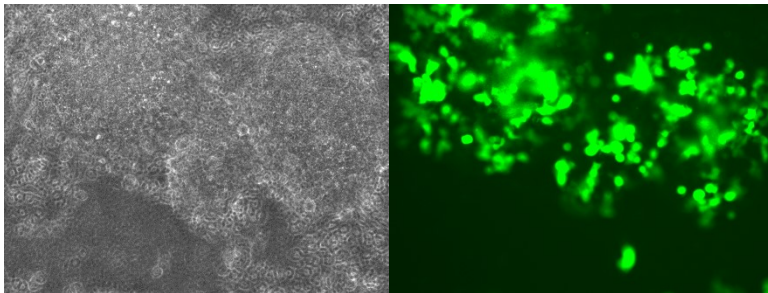


Abbildung 4.10: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in AIMV gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde AIMV als Expressionsmedium zugegeben.

Es zeigt sich eine vergleichbar gute Transfektion zwischen den Zellen der bereits etablierten Methode, mit DMEM als Anzucht- und Expressionsmedium (siehe Abb 4.7), sowie den Zellen, welche in DMEM/AIMV gehalten und ausgesät wurden und anschließend DMEM/AIMV oder AIMV als Expressionsmedium gewählt wurde (Abb. 4.8 und 4.9). Bei AIMV als alleiniges Nährmedium zur Zucht der Zellen und zur Expression trat ebenfalls ein Adhärenzverlust auf (4.10).

4.2.2 Transfektion der Expressionsvektoren

Die Transfektion der HEK 293T-Zellen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Konzentrationen der DNA Proben wurden mittels NanoDrop gemessen. Die zu transfizierende DNA-Menge betrug jeweils 15 µg. Als Transfektionskontrolle fungierte GFP, dessen Expression in der Fluoreszenzmikroskopie geprüft wurde. Als Negativkontrolle wurde, statt DNA, Wasser zum Transfektionsansatz hinzugegeben. Außerdem wurden Wachstumskontrollen der Zellen mit und ohne Mediumwechsel mitgeführt. Die Proteinexpression der VlsE-Fragmente wurde in DMEM bzw. DMEM/AIMV als Kulturmedium und DMEM bzw. AIMV als Expressionsmedium

durchgeführt, um zu prüfen ob die Proteine in beiden Medien exprimiert werden. Die Expression wurde mittels proteinbiochemischer Nachweisemethoden aus dem Zellkulturüberstand geprüft.

4.3 Nachweis der durch HEK293T hergestellten Proteine

4.3.1 Ergebnisse zu Eigenschaften und Stabilität der rekombinanten Proteine

Die Berechnung der isoelektrischen Punkte und des Molekulargewichts der synthetisierten Proteine erfolgte mit dem Web-Tool Protein Calculator v3.4.

Protein	Isoelektrischer Punkt	Molekulargewicht [kDa] Berechnet	Molekulargewicht [kDa] Western Blot
VlsE1	5,01	19,455	21 18,1
VlsE2	5,52	17,25	18,1
VlsE3	5,03	18,48	20,15
VlsE4	4,94	16,696	21,25 20,2

Die im Westernblot vermessenen Banden und über einen Proteinstandard ausgerechneten Molekulargewichte liegen meist zwischen fünf und acht Prozent höher, als die mit der Hilfe der Aminosäuresequenz errechneten Massen. VlsE1 zeigt häufig Doppelbanden, wobei eine über dem errechneten Wert liegt und die zweite darunter. Im Fall von VlsE4 beträgt der Massenunterschied sogar etwa 25 %. Auch hier liegen meist Doppelbanden vor. Beide bei ca. 20 kDa, was ebenfalls schwerer ist als über die Aminosäuresequenz berechnet.

4.3.2 Proteinnachweis im Westernblot nach Transfektion in DMEM

Das Standardmedium für die HEK 293T Zelllinie ist DMEM. Deshalb wurde die erste Transfektion nach erfolgreicher Klonierung und Reinigung der Vektoren in diesem Medium durchgeführt. Die Expressionsanalyse im Westernblot, nach Ernte am Tag

drei, erfolgte mit dem Detektionsantikörper anti-Flag, gefolgt von Goat-anti-Mouse-IgG-Biotin und Streptavidin-ALP. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4.11.

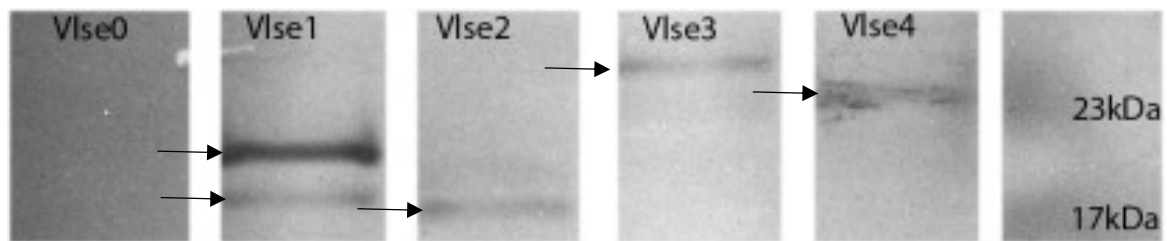


Abbildung 4.11: Westernblot zum Expressionsnachweise der einzelnen Vlse-Fragmente nach Transfektion mit DMEM als Anzucht und Expressionsmedium.

Die Negativkontrolle Vlse0 entspricht dem Transfektionsansatz ohne Zugabe von DNA. Es lassen sich alle Vlse-Fragmente nachweisen, wobei die Bandenstärke relativ schwach ausfällt. Beim Auftreten vom Doppelbanden ist es möglich, dass es sich dabei um Abbauanden, Dimerbildung oder Proteinmodifikationen handelt.

4.3.3 Proteinnachweis im Westernblot nach Transfektion in DMEM/AIMV

Die Transfektionseffizienz zeigte im Vorversuch mit DMEM/AIMV als Anzuchtmedium und AIMV als Expressionsmedium, ähnliche Ergebnisse wie in DMEM allein. Ob auch die Vlse-Genprodukte produziert werden, wurde ebenfalls im Westernblot geprüft und in Abbildung 4.12 dargestellt. Das Detektionssystem war analog, nur wählte man als Nachweisenzym HRP statt ALP, da der Hintergrund dadurch weniger Signal generiert.

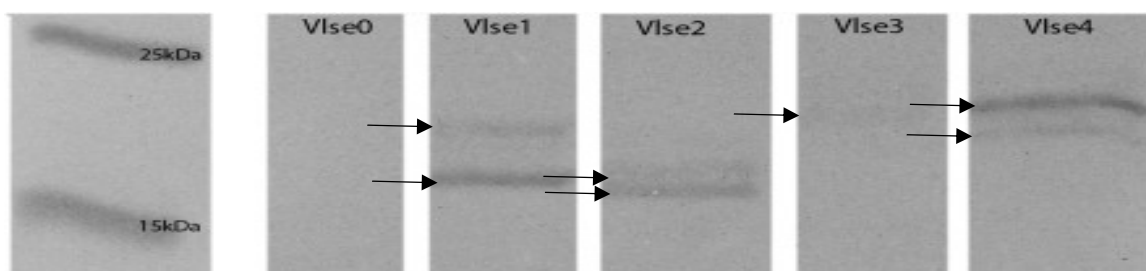


Abbildung 4.12: Westernblot zum Expressionsnachweis der einzelnen Vlse-Fragmente nach Transfektion mit DMEM/AIMV als Anzuchtmedium und AIMV als Expressionsmedium.

Es lassen sich ebenfalls alle Vlse-Fragmente nachweisen, allerdings Vlse3 nur sehr schwach.

4.3.4 Versuch der Quantifizierung mittels Kolloidaler Coomassiefärbung nach Kang

Da im Westernblot keine Aussage über die vorliegende Proteinmenge im Überstand der Zellkultur gemacht werden kann wurde die modifizierte Coomassiefärbung nach Kang durchgeführt. Die Proteinmenge schien jedoch so gering zu sein, dass die Färbung im Gel auf den VlsE-Laufstrecken keinerlei Banden zwischen 15 und 25 kDa zeigte. Lediglich das im Zellkulturmedium enthaltene BSA konnte nachgewiesen werden. Der Proteinmarker und der mitgeführte BSA-Standard zeigten ebenfalls entsprechende Banden.

4.3.5 Orientierenden Quantifizierung mittels Silberfärbung

Da durch die Coomassiefärbung keine Quantifizierung erfolgen konnte wurde zur Orientierung die sensitivere Silberfärbung durchgeführt. Auch durch die Silberfärbung ließen sich keine Banden im entsprechenden kDa-Bereich nachweisen. Da im relevanten Bereich allerdings auch BSA-Banden vorhanden sind und möglicherweise schwach ausgeprägte VlsE-Banden dadurch verdeckt sein könnten, ist die Beurteilung schwierig.

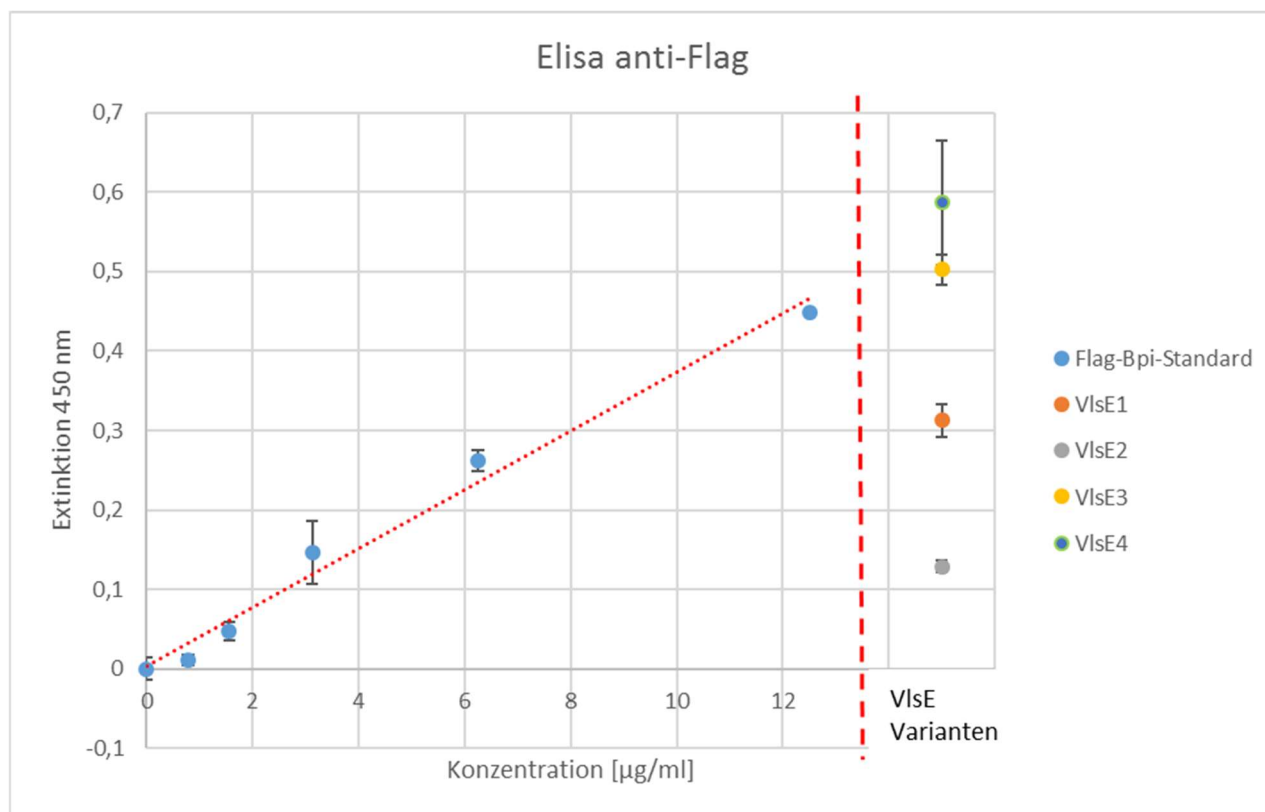
4.3.6 Versuch der Quantifizierung mittels ELISA

Da eine Schätzung der Menge des rekombinant hergestellten Proteins mittels Gelfärbungen nicht möglich war wurde dafür ein direkter ELISA über anti-Flag M2 als Detektionsantikörper etabliert. Als Konzentrationsstandard diente ein laborintern rekombinant hergestelltes Protein, nämlich Bpi-Flag, welches ebenfalls eine Flag-Tag-Sequenz enthält. Die Ergebnisse verstehen sich bereits abzüglich der Negativkontrollen. Als solche dienten für die Standardwerte das Verdünnungsmedium und für die VlsE-Varianten der Überstand des VlsE0-Kontrollansatzes.

Ergebnisse

Bpi-Flag [µg/ml]	MW oD	STAW oD
10	0,448	0,002
5	0,2615	0,0135
2,5	0,1465	0,0395
1,25	0,0465	0,0115
0,25	0,011	0,006
0	1,3878E-17	0,014

VlsE- Variante	MW oD	STAW oD
1	0,3125	0,0205
2	0,1285	0,0075
3	0,503	0,019
4	0,5865	0,0785



An der Geraden der Standardwerte erhält man folgende Konzentrationen für die VlsE-Varianten:

Variante	c [$\mu\text{g/ml}$]
VlsE1	8,4
VlsE2	3,5
VlsE3	13,6
VlsE4	15,8

Um die Antigene im Elispot einzusetzen wird eine Konzentration von mindestens $80\mu\text{g/ml}$ im Zellkulturüberstand benötigt. Die hergestellten Antigene liegen also in zu geringer Konzentration vor. Eine anschließende Reinigung sollte daher die Proteine konzentrieren und störende Substanzen aus dem Medium entfernen.

4.3.7 Ergebnisse der Proteinreinigung

Um die Proteine aus dem Zellkulturmedium zu extrahieren und deren Konzentration zu erhöhen wurde die Proteinreinigung mittels anti-Flag-Affinity Sepharose durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung im SDS-Gel und Nachweis mittels Gelfärbung nach Coomassie-Kang und Silberfärbung. Zur orientierenden Konzentrationsbestimmung wurde eine BSA-Verdünnungsreihe von $100\mu\text{g/ml}$ bis $0,1\mu\text{g/ml}$ in Zehnerschritten durchgeführt und aufgetragen. Die Färbung mittels Coomassie-Kang zeigte bei VlsE1 und VlsE2 eine schwache Bande im erwarteten Bereich zwischen 15 und 25 kDa. Die Konzentration beträgt abgeschätzt $< 10\mu\text{g/ml}$ für VlsE1 und $10\text{--}20\mu\text{g/ml}$ für VlsE2 (siehe Abb. 4.13). Die anderen Varianten konnten nicht nachgewiesen werden. Das Gel wurde im Anschluss einer Silberfärbung unterzogen. Es konnten damit aber keine weiteren Banden detektiert werden.

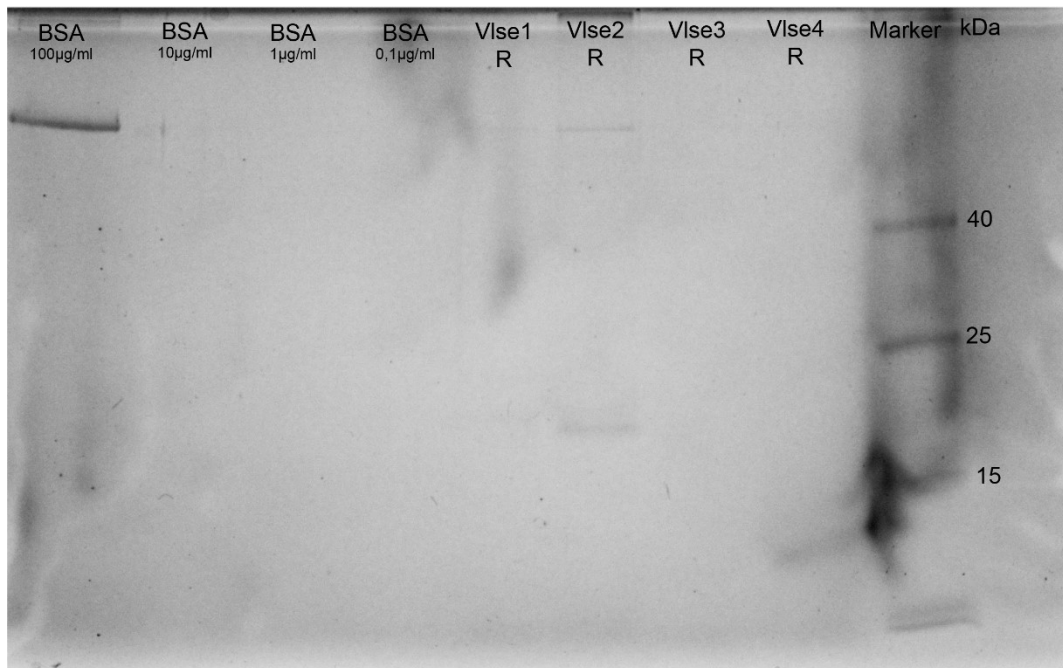


Abbildung 4.13: Kolloidale Commassie-Färbung nach Kang der Proben nach der Proteinreinigung.

4.4 Herstellung einer Bacmid-DNA für das Baculoexpressionssystem

4.4.1 Einfügen der Schnittstelle für *EcoRI*

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde zum Einfügen einer *EcoRI*-Schnittstelle, eine PCR mit geeigneten Überhangprimern durchgeführt.

Die berechneten Bandengrößen für die VlsE-DNA-Fragmente betrugen:

Fragment VlsE1: 599 bp

Fragment VlsE2: 586 bp

Fragment VlsE3: 593 bp

Fragment VlsE4: 539 bp

Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel zeigt sich die richtige Bandengröße zwischen 500 und 600 bp.

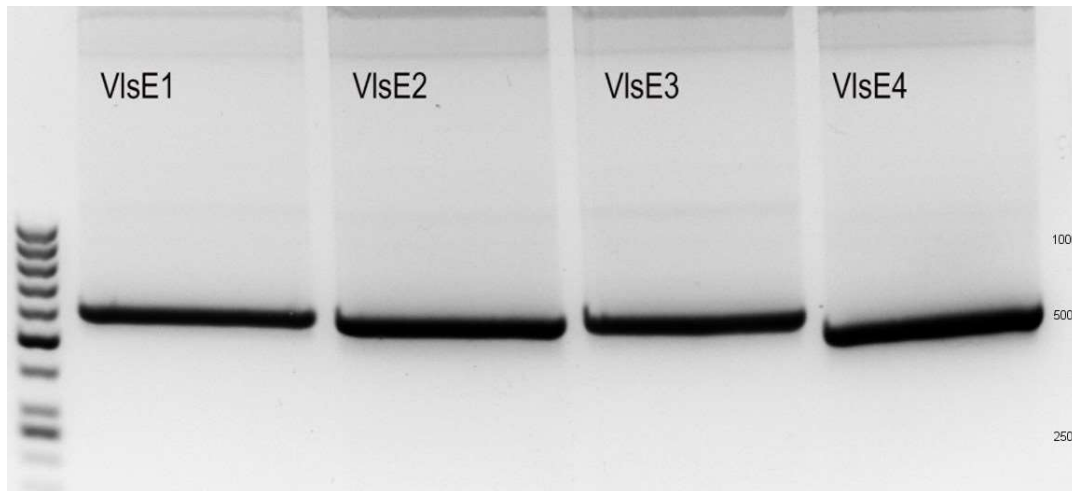


Abbildung 4.14: Einfügen einer EcoRI-Schnittstelle, Nachweis der PCR-Produkte

4.4.2 Einfügen der *VlsE*-Genfragmente in den *pFastBac*-Vektor

Die Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert und die DNA-Menge mittels Nanodrop vermessen:

	[ng/μl]
pcr3-VlsE3_1	580,1
pcr3-VlsE3_2	978,2
pcr3-VlsE4_1	841,4
pcr3-VlsE4_2	1164,3
pFastBacT1	1285,1
pFastBacT1	2296,1

Da ausreichend Produkte vorhanden waren konnte die Ligation der Fragmente und des pFastBac-Vektors durchgeführt werden. Hierfür erfolgte zunächst der Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI und anschließender Gelelektrophorese (Abb. 4.15).

Ergebnisse

Die berechneten Bandengrößen der Fragmente betrugen:

Fragment VlsE1: 585 bp

Fragment VlsE2: 572 bp

Fragment VlsE3: 579 bp

Fragment VlsE4: 525 bp

pFastBac-Vektor: 4676 bp

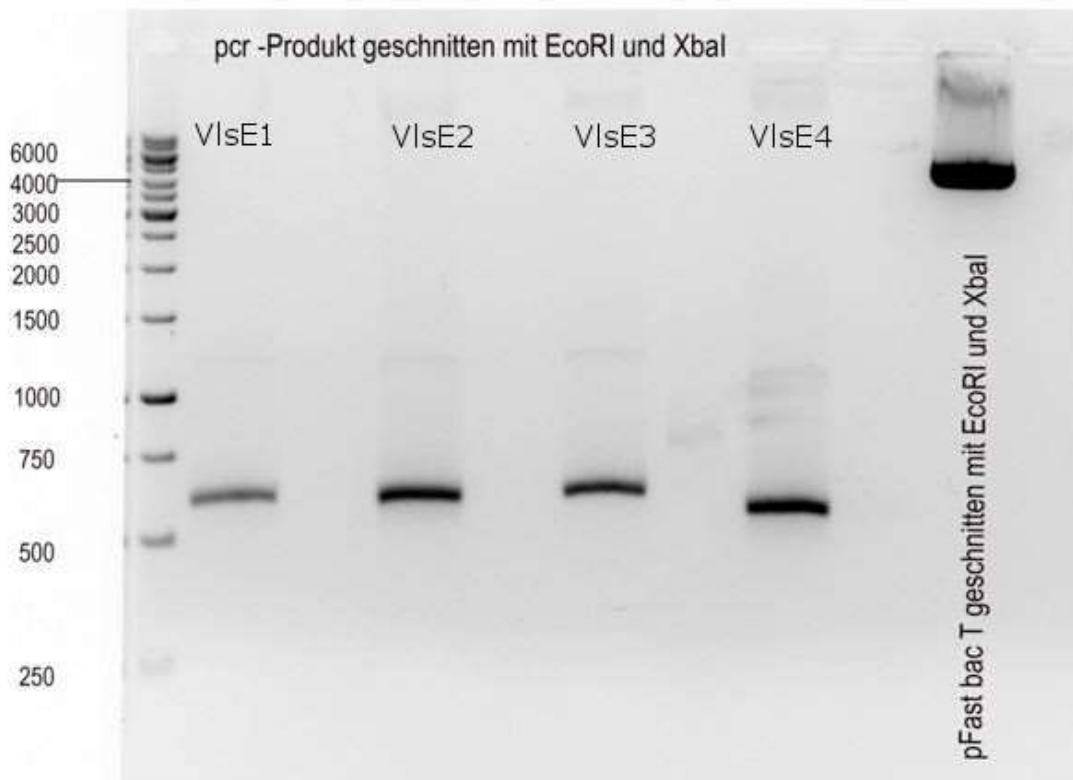


Abbildung 4.15: Verdau mit EcoRI und XbaI

Nach erfolgter Ligation der VlsE-Genfragmente mit dem pFastBac-Vektor, wurde ein Verdau mit EcoRI und anschließender Elektrophorese der Produkte durchgeführt. Es zeigen sich die erwünschten VlsE-Banden in der richtigen Größe, allerdings liegt eine weitere Bande kleiner 500 bp vor. Hier ist auf eine mögliche Staraktivität von EcoRI hinzuweisen, welche aber die folgenden Experimente nicht stören dürfte (Abb. 416).

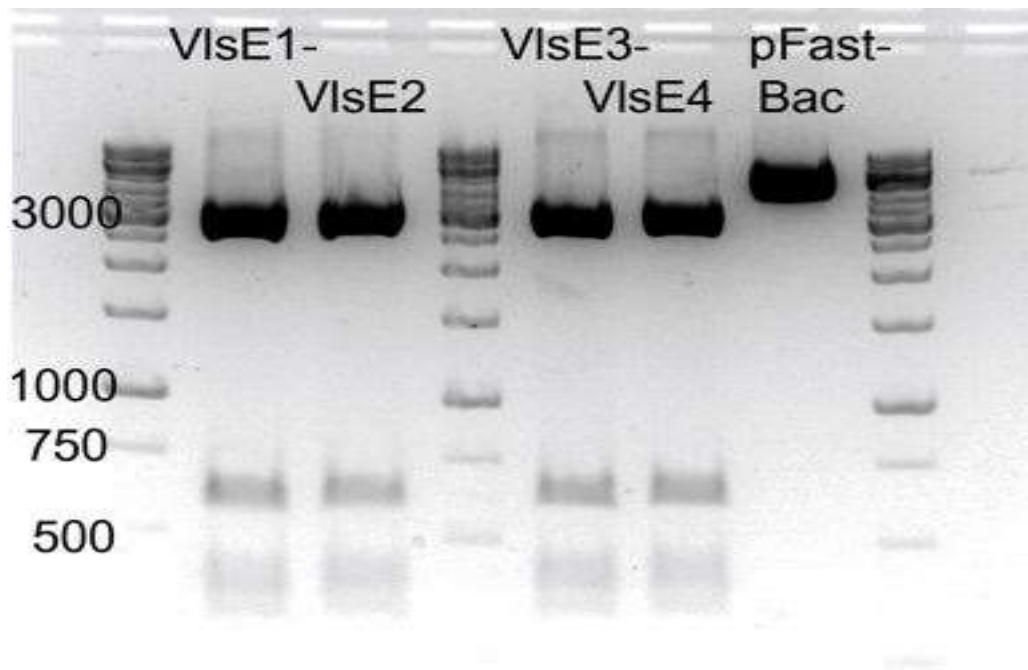


Abbildung 4.16: Verdau des Ligationsansatzes VlsE-Fragment/pFastBac

Nach Transformation in den *E. coli* Stamm DH10Bac und Klonierung des Bacmids durch Selektionierung der relevanten weißen Kolonien, wurden die ausgewählten Klone, wie im Methodenteil beschrieben, mittels PCR auf den Inhalt des gewünschten Gens geprüft. Als Negativkontrolle fungierte der pCR.3-Vector mit VlsE1-Insert.

Rechnerisch erwartete Bandengrößen:

Fragment VlsE1: ca. 2900 bp

Fragment VlsE2: ca. 2900 bp

Fragment VlsE3: ca. 2900 bp

Fragment VlsE4: ca. 2850 bp

Bacmid einzeln: ca. 300 bp

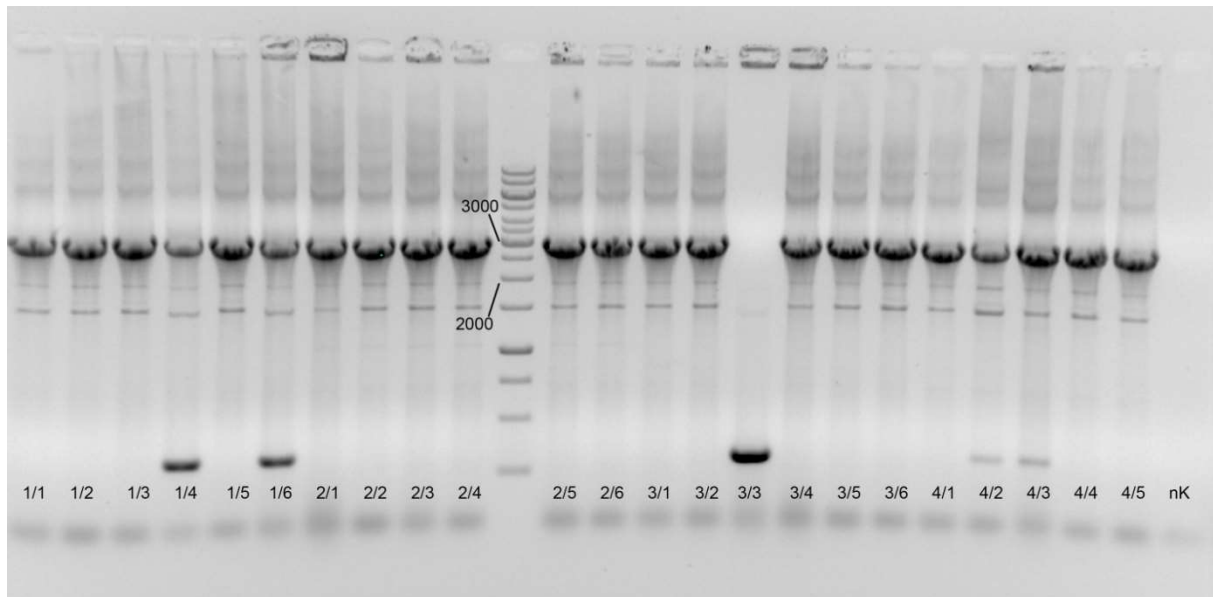


Abbildung 4.17: PCR zum Nachweis des Zielgens der VlsE-Varianten in der Bacmid-DNA

Die einzelnen Klone enthalten zum größten Teil das Zielgen, welches wie erwartet knapp unter der 3000 bp Bande detektiert wird (Abb. 4.17). Klon 3/3 scheint das gewünschte Insert nicht zu tragen. Für die weitere Bacmidamplifikation und Aufreinigung wurden die Klone 1/2, 2/2, 3/2, und 4/5 weiterverarbeitet.

4.4.3 Bacmidpräparation

Die präparierten Bacmide wurden im Nanodrop vermessen:

	[ng/μl]
Bacmid - VslE 1	327,0
Bacmid - VslE 2	379,8
Bacmid - VslE 3	305,8
Bacmid - VslE 4	386,7

4.4.4 Transfektion der Sf9-Zellen mit rekombinanten Bacmid

Das Virus sollte 72 Stunden nach erfolgter Transfektion ins Medium sezerniert werden. Deshalb wurde die Kultur täglich mikroskopisch nach Zeichen einer viralen Infektion geprüft.

Die Virusernte erfolgte, sobald Zeichen der späten Infektion auftraten. Auch die Ernte der rekombinanten Proteine nach Infektion der Zellen mit Baculovirus wurde nach mikroskopischer Kontrolle der Infektionszeichen durchgeführt. Als zusätzliche Infektionskontrolle fungierte, neben den zellmorphologischen Veränderungen, hierbei ein Baculovirus mit Gfp als Expressionsprotein, welches fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden konnte. Zum Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen diente eine Wachstumskontrolle ohne Viruszugabe.

Die Infektionszeichen stellen sich je nach Infektionsdauer folgendermaßen dar:

Frühe Zeichen in den ersten 24 Stunden:

- Vergrößerung des Zelldurchmessers um 20 – 25 %
- Vergrößerung des Zellkerns

Späte Zeichen (24 -72 Stunden):

- Einstellung des Zellwachstums
- Die Zellen erscheinen aufgrund des viralen „Buddings“ granuliert
- Ablösung der Zelle vom Boden der Zellkulturflasche oder Platte

Sehr späte Zeichen (> 72 Stunden):

- Zelllyse

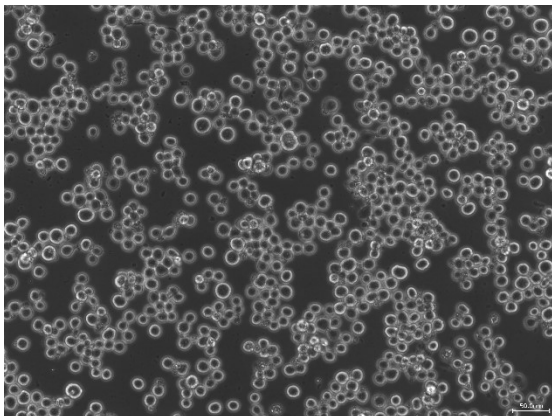


Abbildung 4.18: Wachstumskontrolle Sf9-Zellen nach 24h

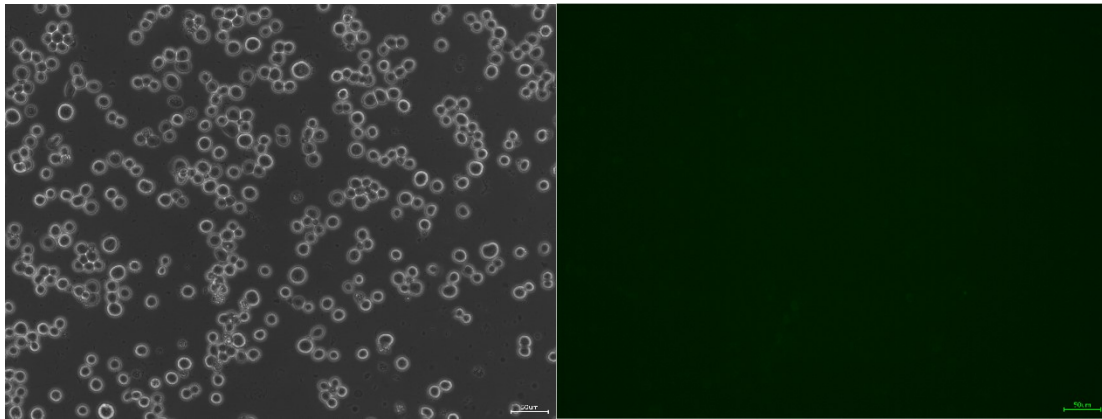


Abbildung 4.19: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 24h

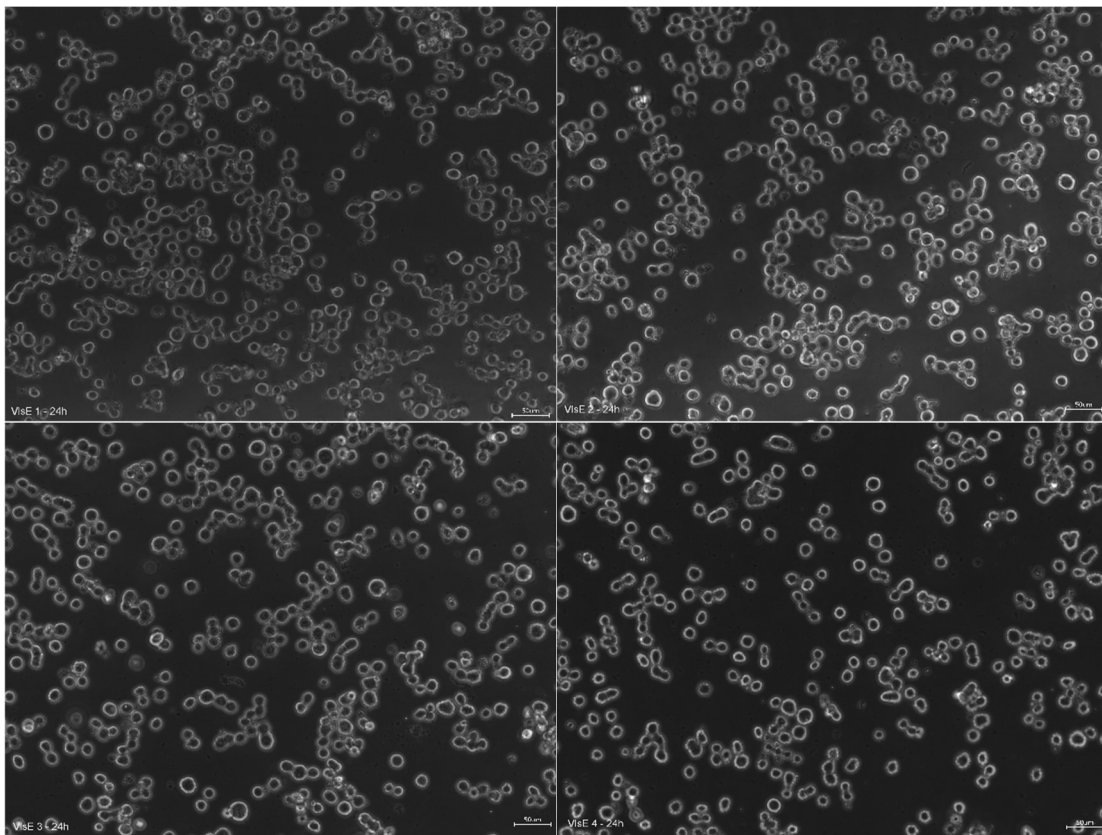


Abbildung 4.20: VisE Varianten 1-4 nach 24h

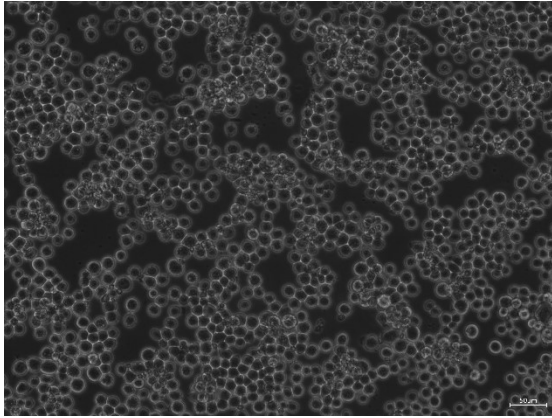


Abbildung 4.21: Wachstumskontrolle sf9-Zellen nach 48h

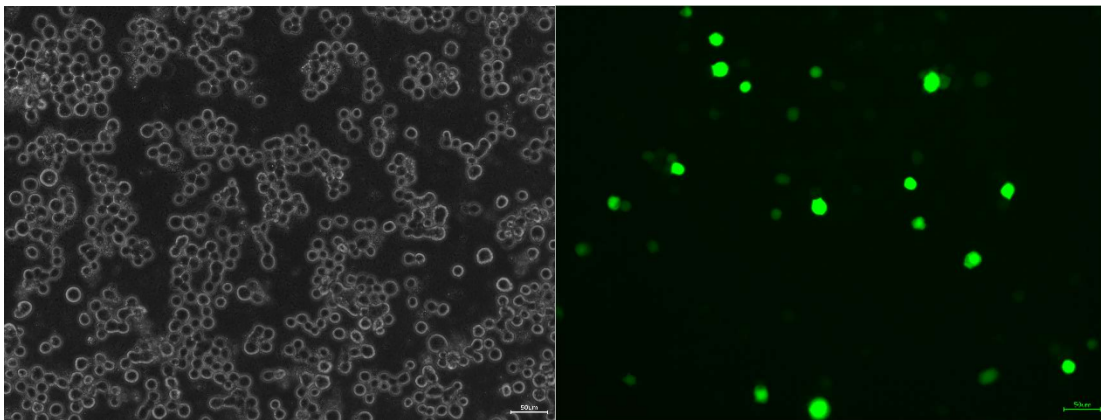


Abbildung 4.22: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 48h

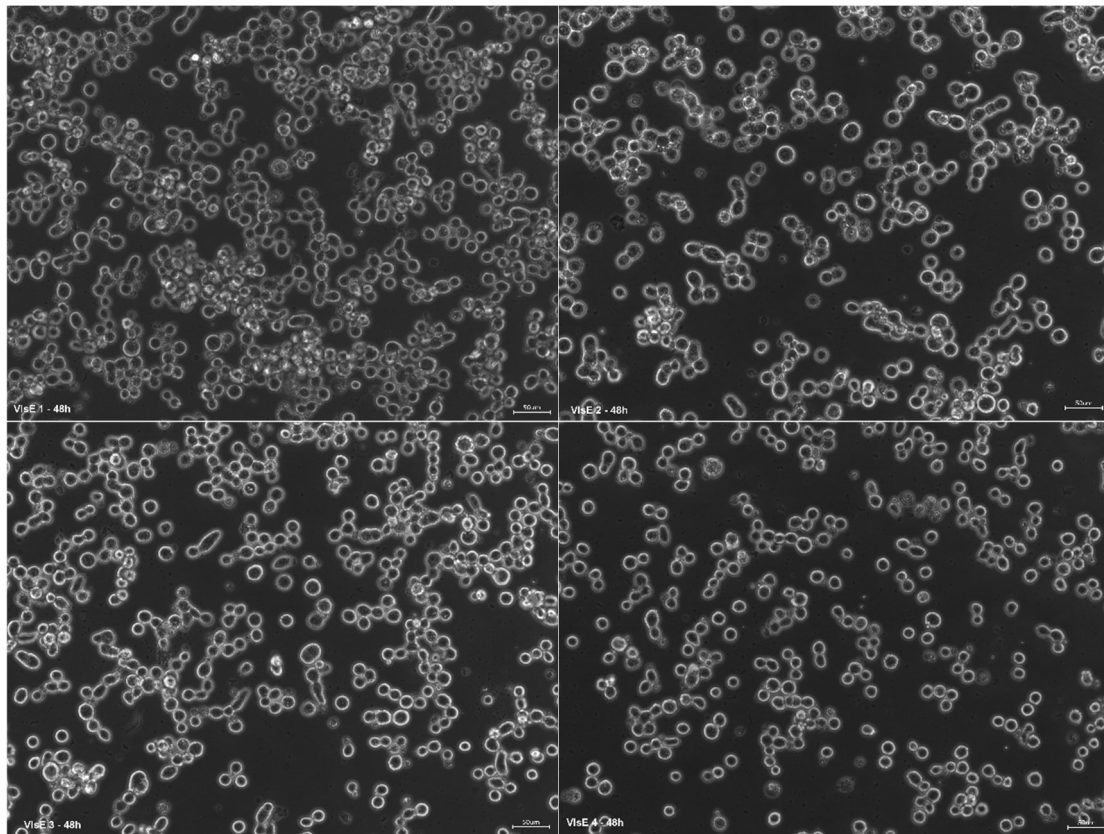


Abbildung 4.23: VisE Varianten 1-4 nach 48h

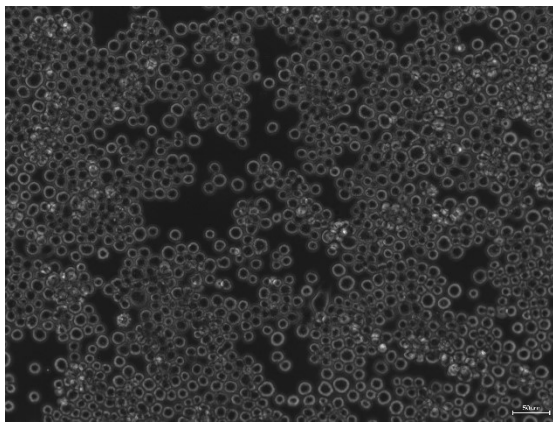


Abbildung 4.24: Wachstumskontrolle sf9-Zellen nach 72h

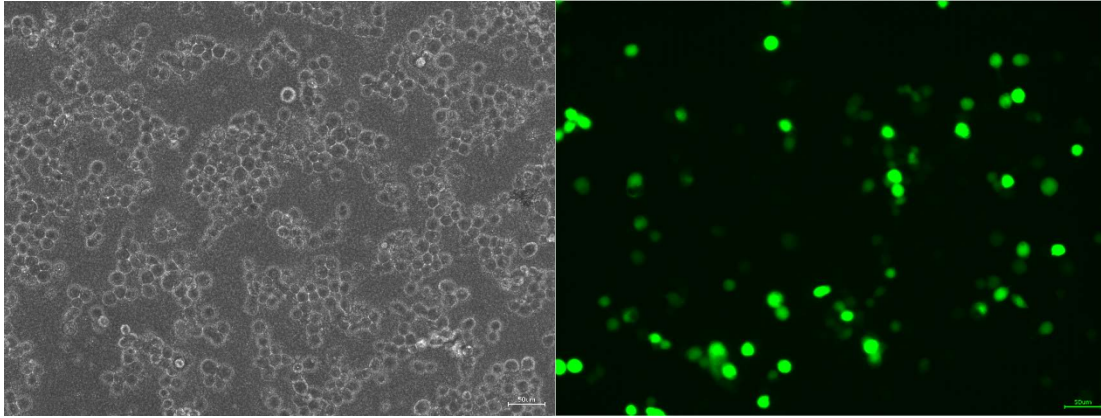


Abbildung 4.25: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 72h

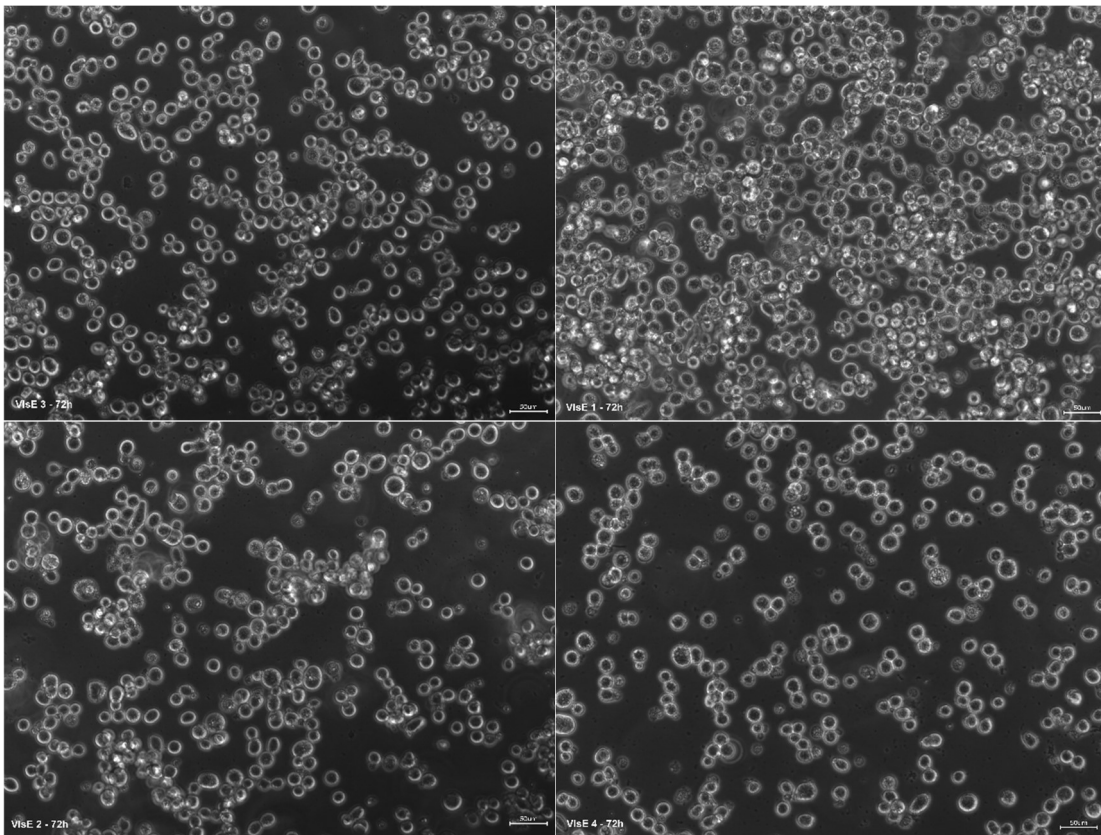


Abbildung 4.26: VlsE-Varianten 1-4 nach 72h

Ergebnisse

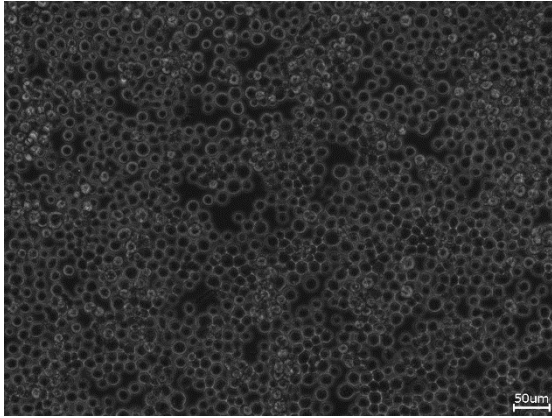


Abbildung 4.27: Wachstumskontrolle sf9-Zellen nach 96h

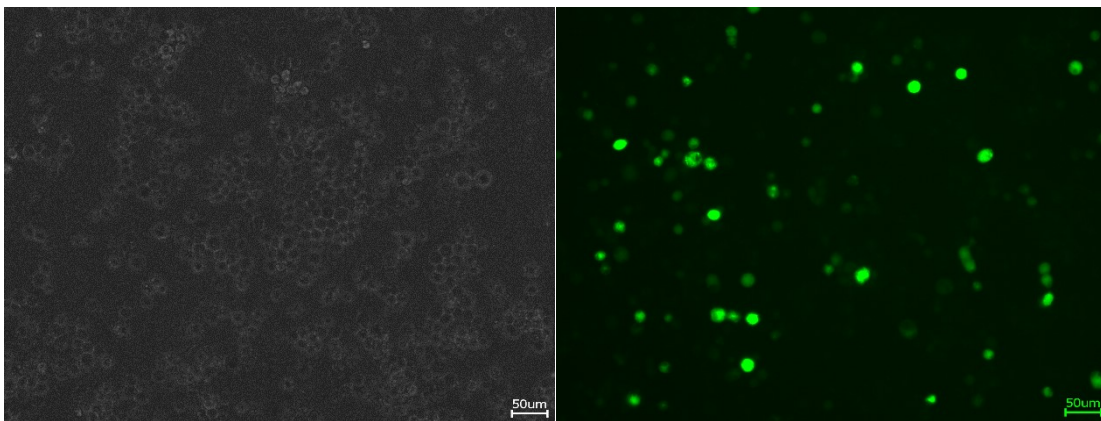


Abbildung 4.28: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 96h

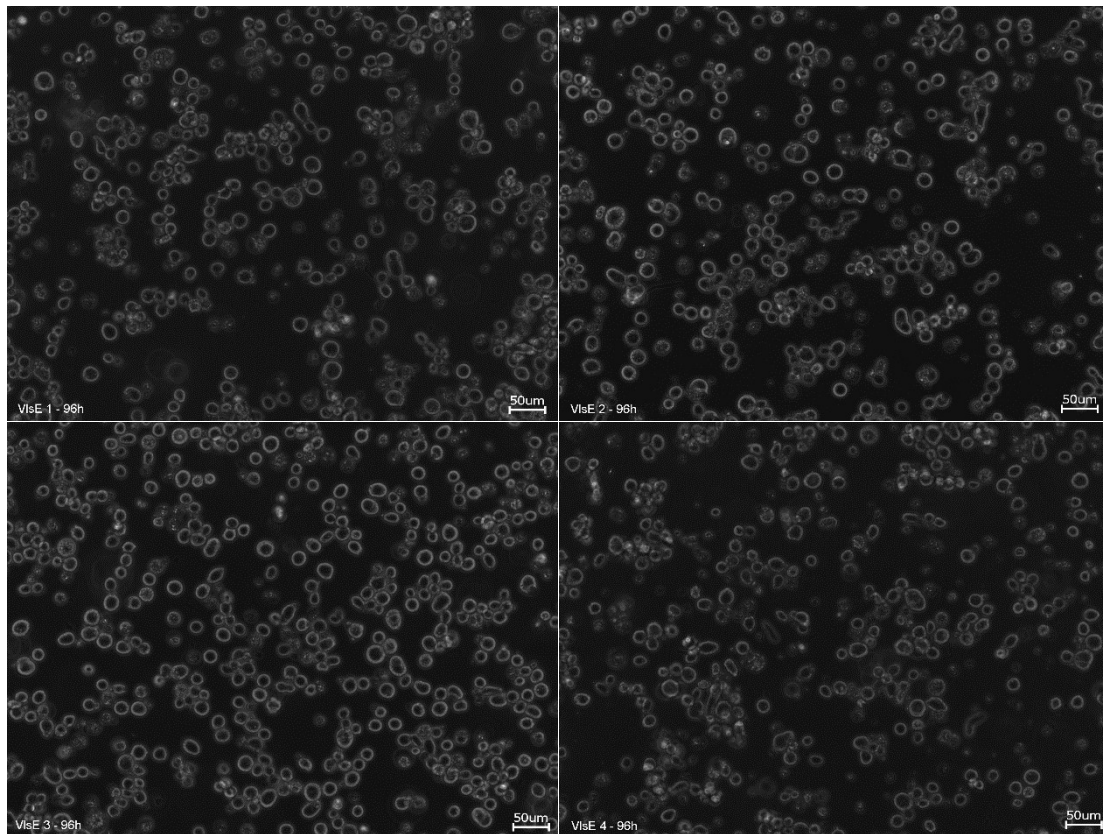


Abbildung 4.29: VisE-Varianten 1-4 nach 96h

4.4.5 Proteinnachweis mittels Silberfärbung im Time Course

Nach Infektion der Zellen wurde acht Tage lang täglich ein Aliquot entnommen, um dieses einer Silberfärbung zu unterziehen. Dadurch sollte der beste Erntezeitpunkt der verschiedenen VlsE-Varianten bestimmt werden. Als Negativkontrolle fungierte hierbei der Überstand nicht infizierter Zellen am Tag acht.

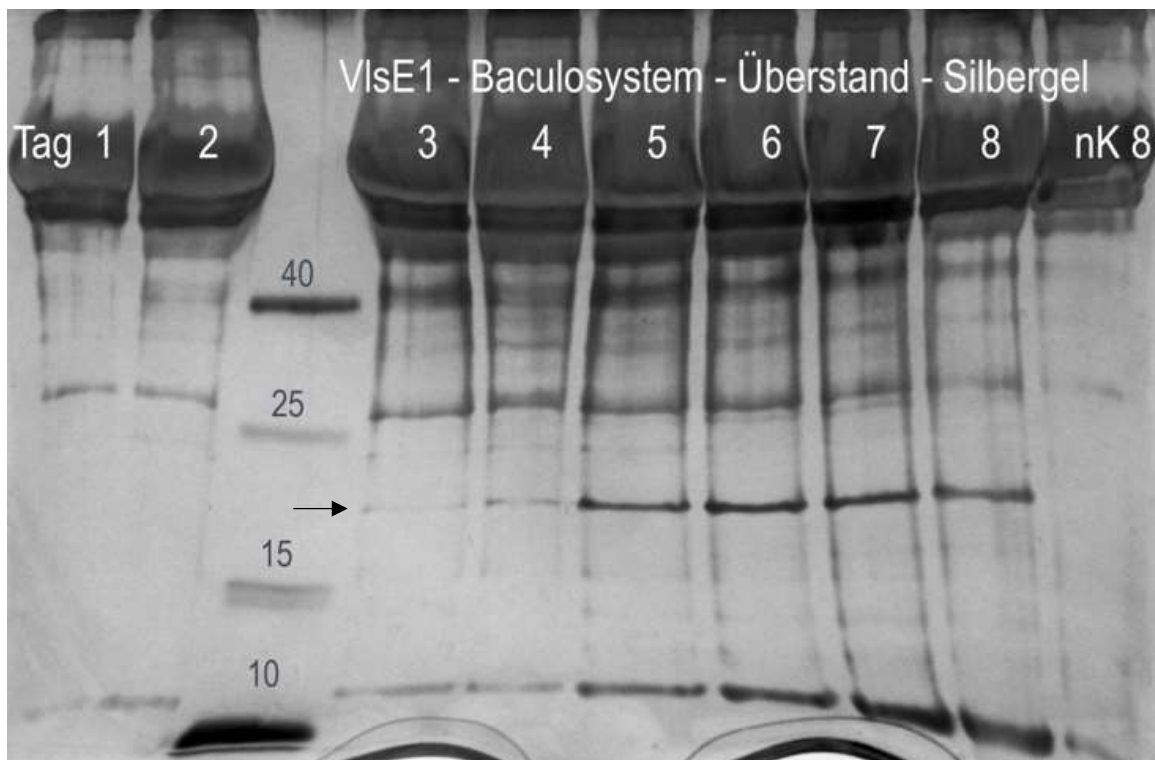


Abbildung 4.30: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE1 im Time Course

Im Überstand der Kultur für VlsE1 lässt sich ab Tag drei eine Bande bei circa 18 kDa nachweisen, was der richtigen Molekülgröße entspräche. Die Banden bestehen bis zum Tag acht fort. Die Negativkontrolle zeigt diese nach drei Tagen neu aufgetretene Bande nicht. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die zusätzliche Bande dem VlsE1-Protein entspricht.

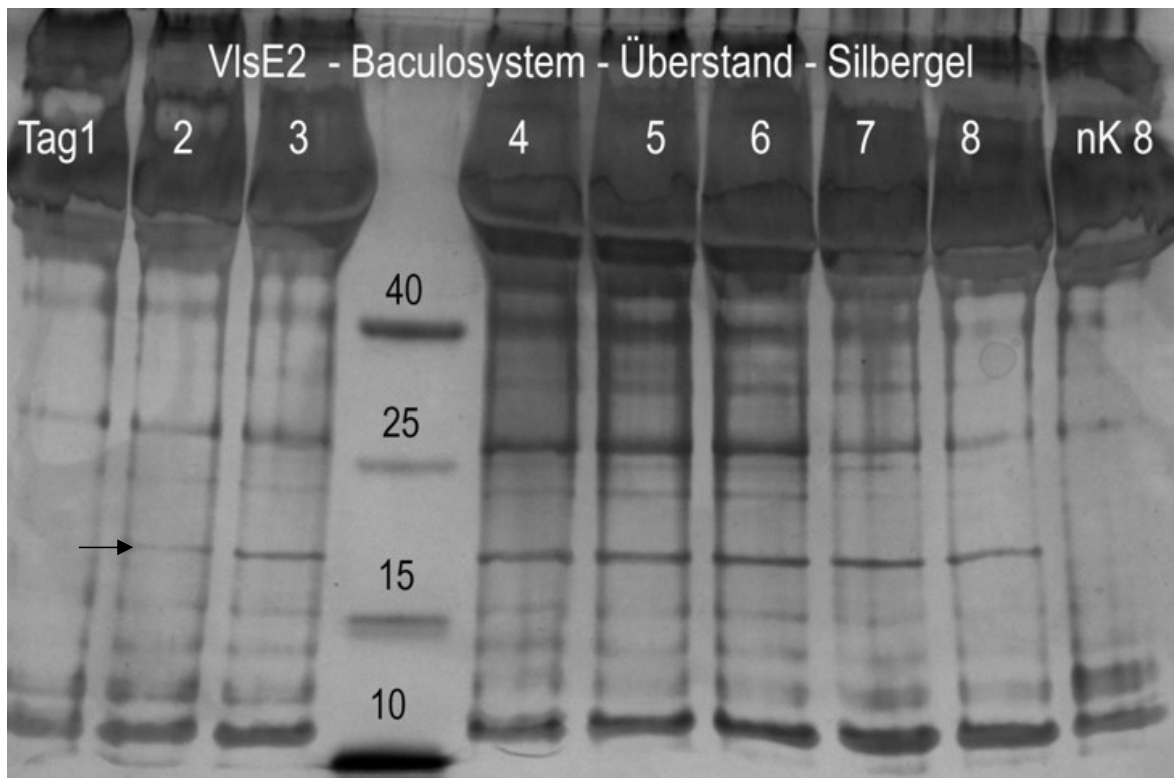


Abbildung 4.31: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE2 im Time Course

Im Überstand der VlsE2 produzierenden Zellkultur lässt sich ab Tag zwei ein Protein bei knapp unter 20 kDa nachweisen, welches bis Tag acht gebildet wird.

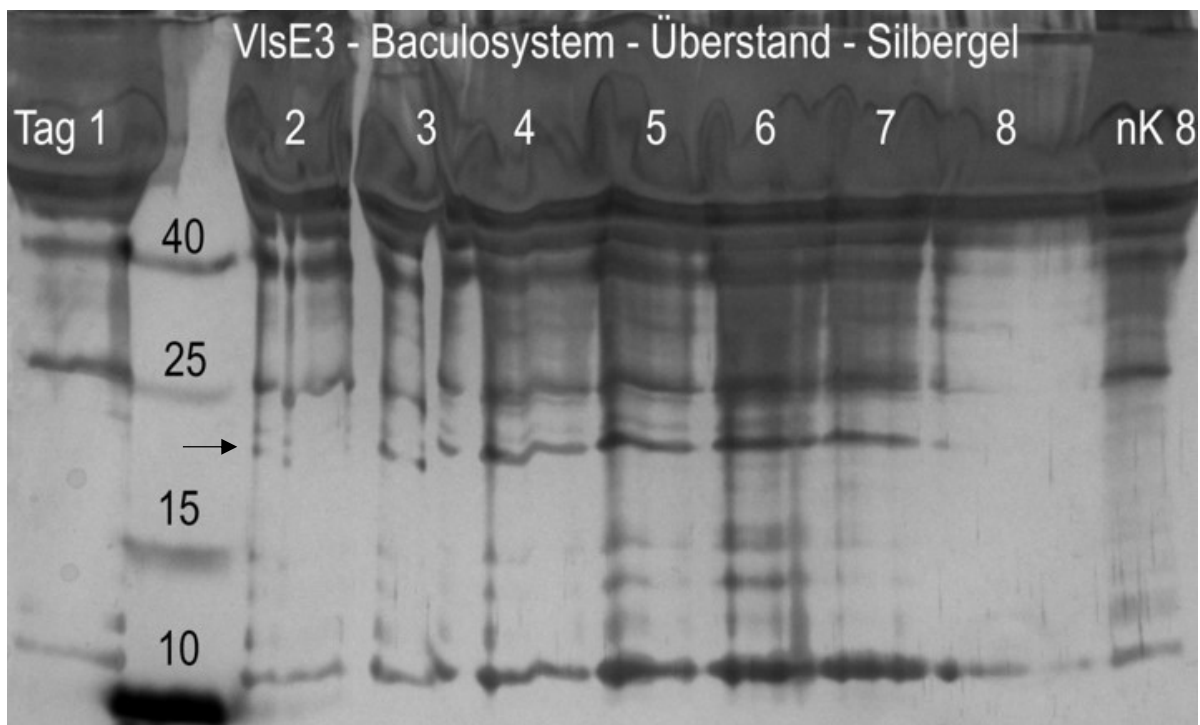


Abbildung 4.32: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE3 im Time Course

Im Überstand der VlsE3 produzierenden Zellkultur findet sich ab Tag zwei ein Protein bei ungefähr 23 kDa. Da VlsE3 laut Berechnung nur 18,48 kDa betragen dürfte, ist das nachgewiesene Protein etwas zu groß. Am siebten Tag lässt es sich noch sicher nachweisen. Die Bande bei Tag acht ist nur teilweise gefärbt und deshalb fraglich.

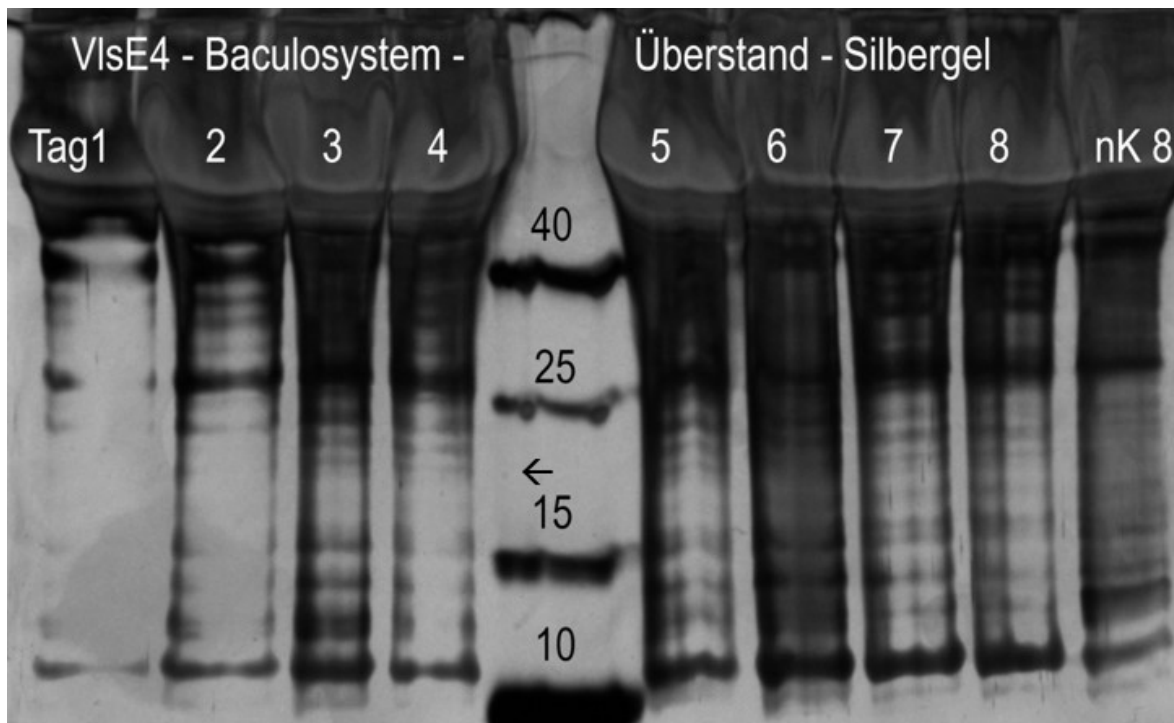


Abbildung 4.33: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand Vlse4 im Time Course

Die Silberfärbung des Überstandes der Vlse4 produzierenden Sf9-Zellen zeigt eine sehr diskrete Doppelbande bei ungefähr 21 kDa von Tag drei bis Tag acht. Auch dieses gebildete Protein ist circa 4 kDa schwerer als für das VlsE4-Protein erwartet.

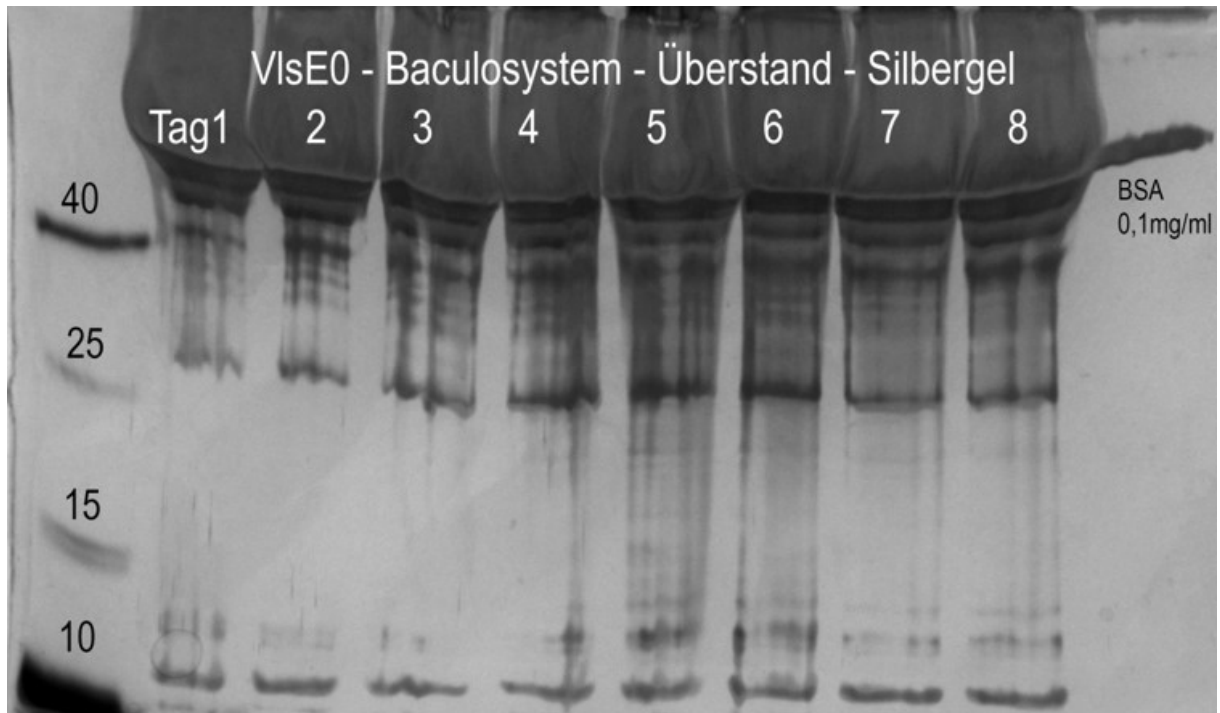


Abbildung 4.34: Silberfärbung sf9-Zellkulturüberstand VlsE0 im Time Course

Die Zellkultur, die mit Baculoviren infiziert wurde, welche keine Sequenzen für VlsE enthalten (VlsE0), zeigt im Überstand wie erwartet auch kein Protein das nicht aus dem Kulturmedium stammt.

4.4.6 Dotblot mit anti-Flag zum Nachweis der VlsE-Varianten aus dem Baculosystem

Im Time Course zeigte sich am Tag sechs für alle VlsE-Varianten eine Proteinproduktion. Da es sich bei der Silberfärbung um ein unspezifisches Verfahren handelt wurde mittels Dotblot die Präsenz der Flag-Tag-Sequenz im rekombinant hergestellten Protein geprüft.

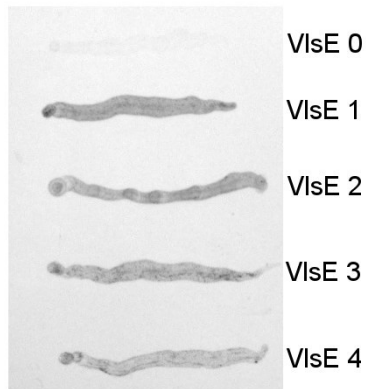


Abbildung 4.35: Dotblot mit anti-Flag

Mit Hilfe des Dotblots, konnte eine Bildung von Flag-Tag tragenden Proteinen in den jeweiligen Zellkulturüberständen der Sf9-Zellen nachgewiesen werden.

4.4.7 Nachweis der mittels Baculosystem produzierten VlsE-Varianten im Westernblot

Der alleinige Nachweis von Proteinen mit Flag-Tag reicht nicht aus. Deshalb wurden zur Bestimmung der Proteingröße Westernblotanalysen durchgeführt.

Westernblot - anti-Flag - VlsE1 - Baculosystem

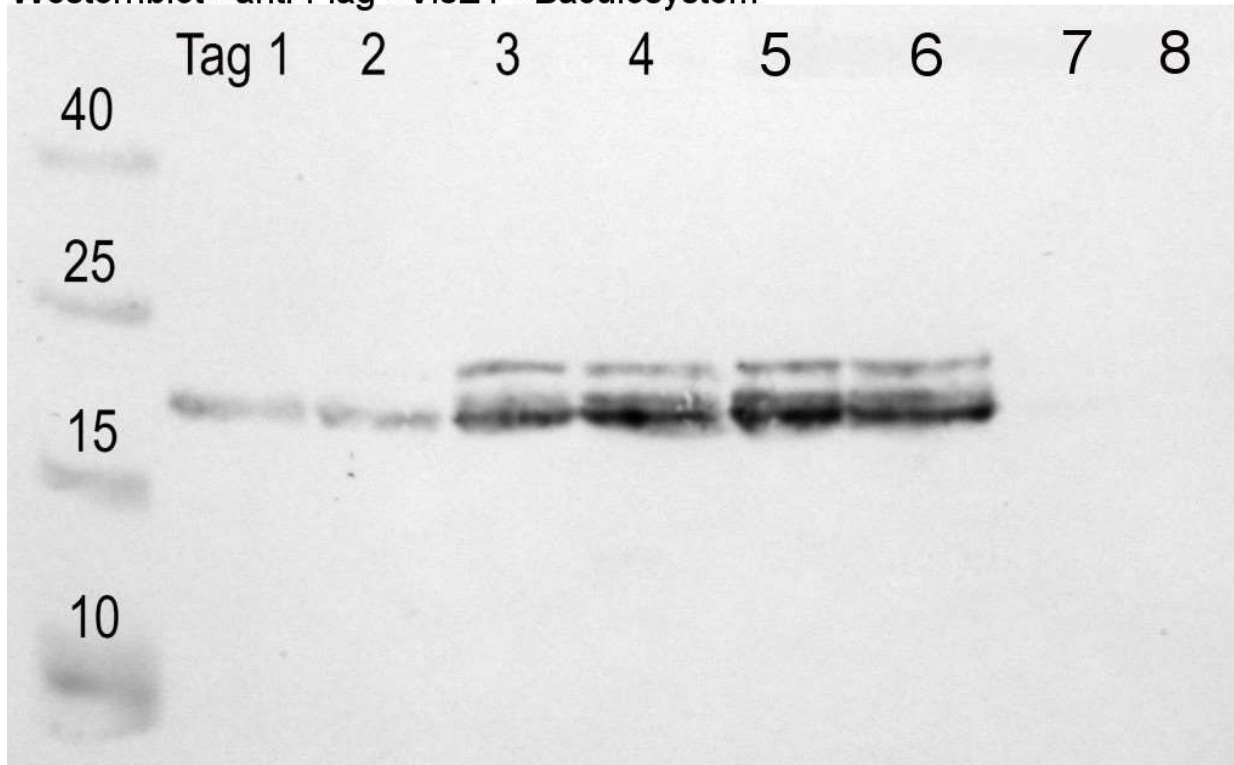


Abbildung 4.36: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE1

Im Westernblot ließ sich VlsE1 von Tag eins bis sechs gut darstellen. Ab dem dritten Tag traten Doppelbanden auf. Die Proteingröße beträgt circa 18 kDa (Abb. 4.36).

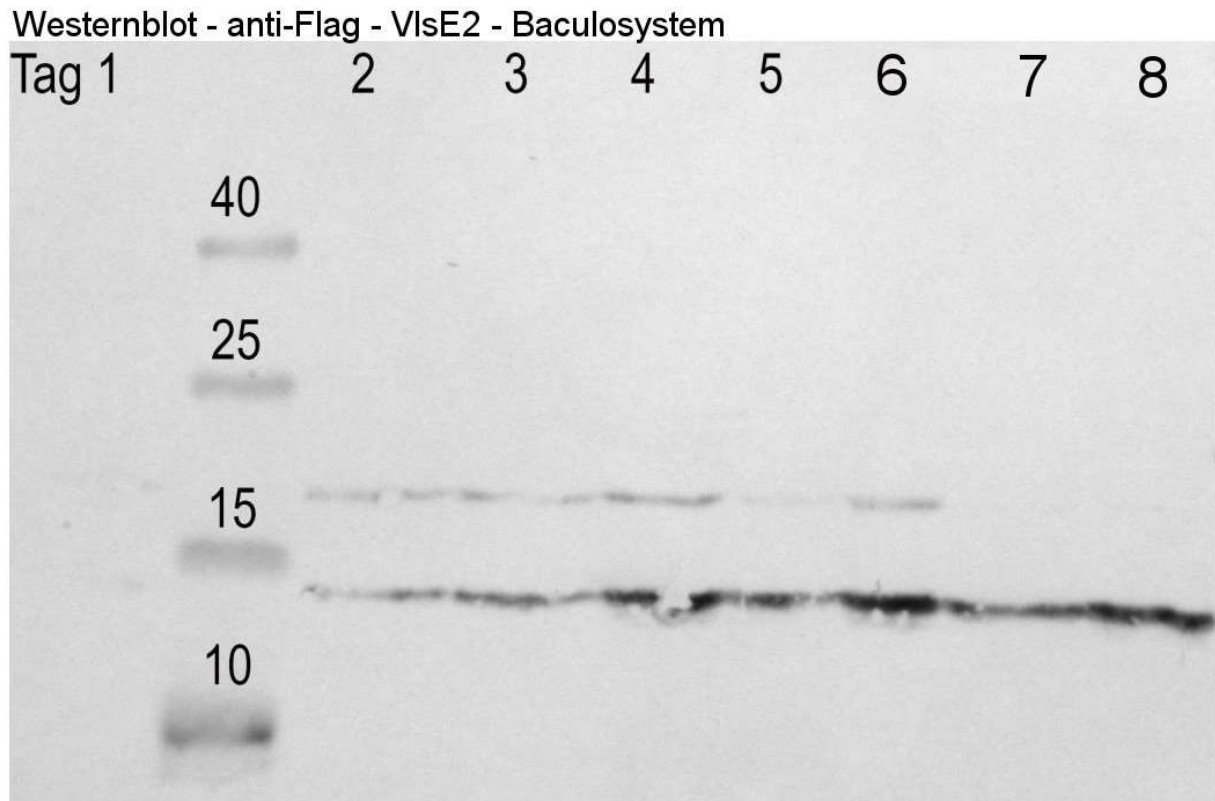


Abbildung 4.37: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE2

VlsE2 konnte von Tag zwei bis sechs detektiert werden. Mit einer Molekülgröße von circa 18 kDa, liegt es im richtigen Bereich. Die Banden knapp unterhalb 14 kDa, zeigen eine stärkere sowie unruhige Färbung und scheinen vor allem im Bereich der Tage sechs und sieben zu konfluieren, weshalb es sich möglicherweise um ein Artefakt handelt (Abb. 4.37).

Westernblot - anti-Flag - VlsE3 - Baculosystem

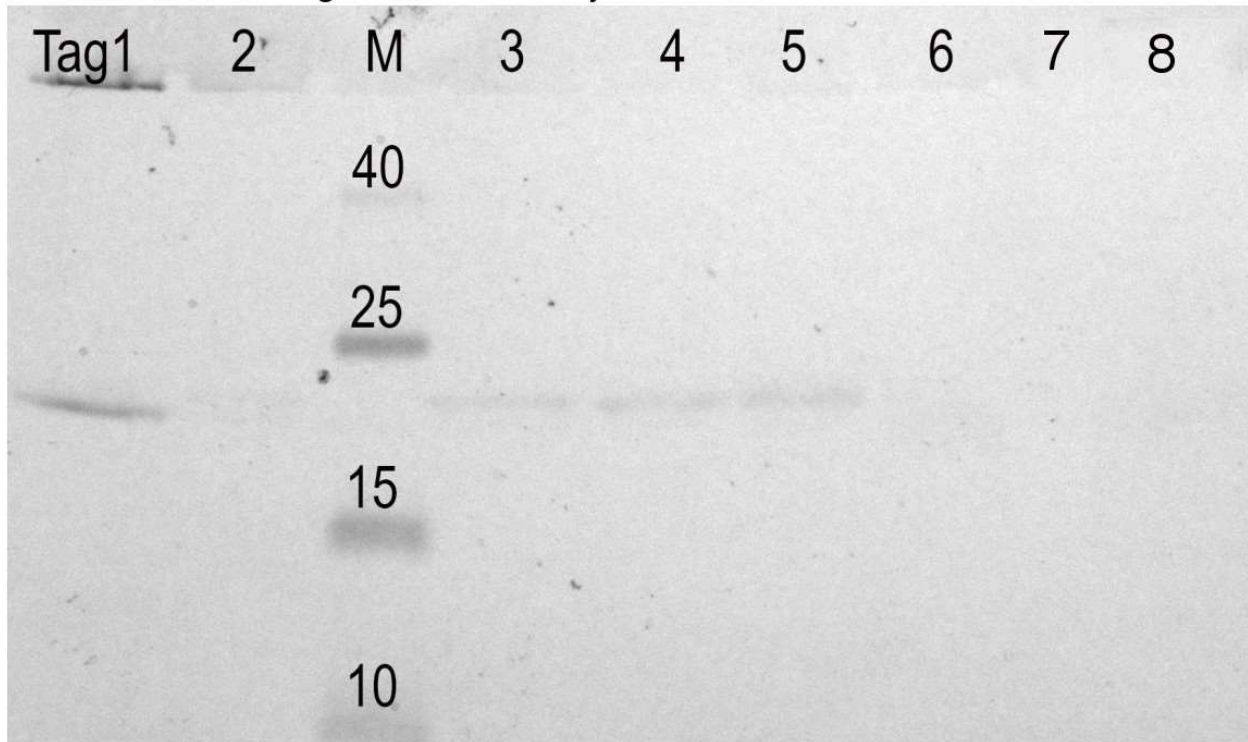


Abbildung 4.38: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE3

Auch der Nachweis von VlsE3 gelingt von Tag eins bis fünf. Die Molekülgröße liegt mit circa 22 kDa um drei bis vier Kilodalton höher als für VlsE3 berechnet (Abb. 4.38)

Westernblot - anti-Flag - VlsE4 - Baculosystem

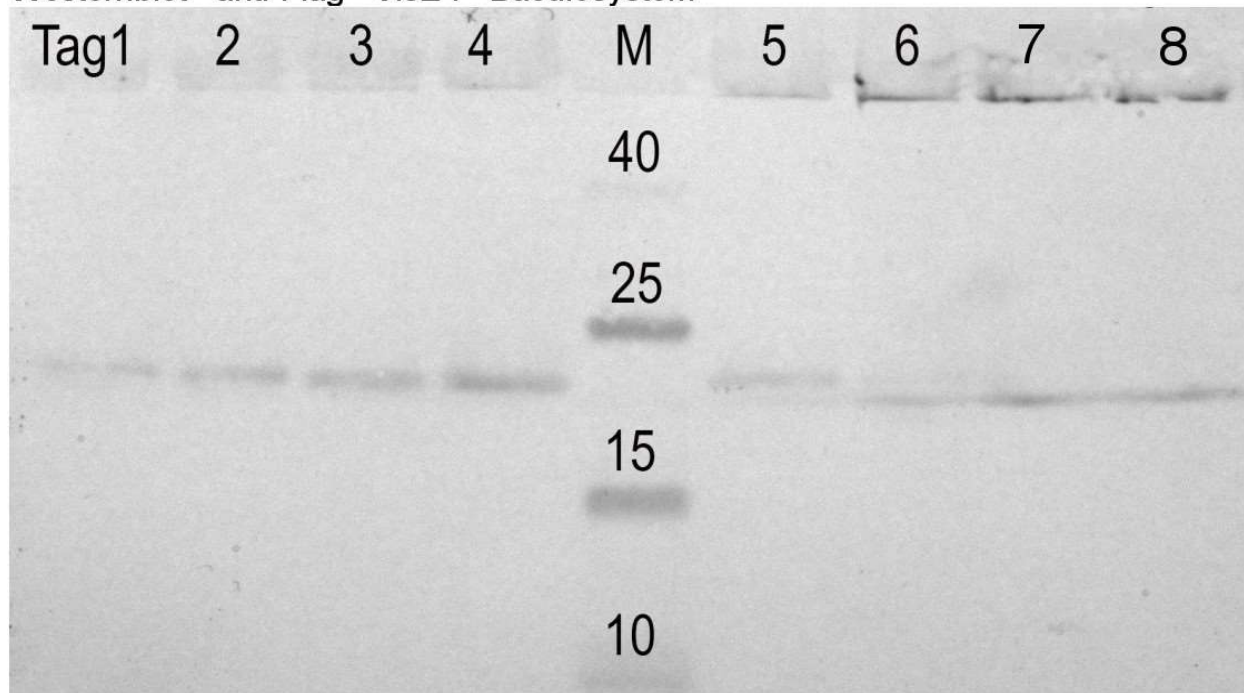


Abbildung 4.39: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE4

Im Zellkulturüberstand von VlsE4 lässt sich das Protein von Tag eins bis acht detektieren, läuft allerdings ebenfalls um vier bis fünf Kilodalton höher als erwartet. Am Tag fünf zeigt sich eine Doppelbande und in den Folgetagen liegen die Banden etwa ein Kilodalton tiefer.

4.4.8 Proteinreinigung mit anti-Flag-Sepharose

Um die gebildeten Proteine vom Zellkulturmedium und BSA zu separieren und die Konzentration zu erhöhen, wurden die Zellkulturüberstände mit einer anti-Flag-Sepharosesäule gereinigt. Im Anschluss konnten die VlsE-Fragmente mittels Silberfärbung dargestellt und deren Konzentrationen, anhand eines mitgeführten BSA-Standards, abgeschätzt werden.

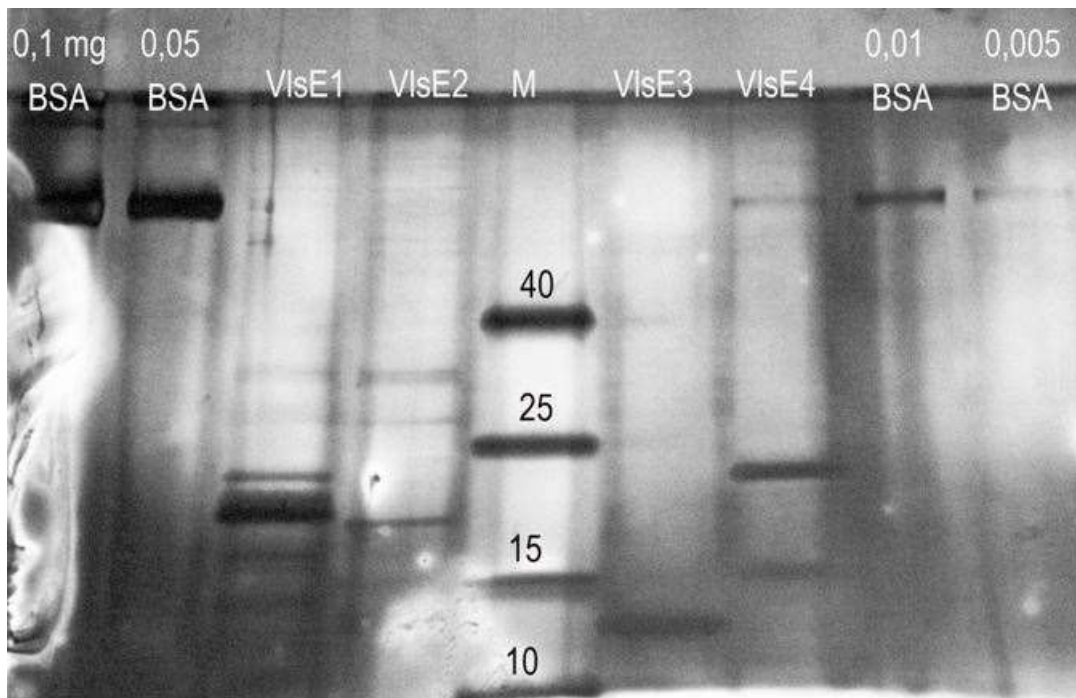


Abbildung 4.40: Silberfärbung nach Proteinreinigung

Es ließen sich folgende Konzentrationen abschätzen:

Variante	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
VlsE 1	~ 60
VlsE 2	~ 5
VlsE 3	~ 20
VlsE 4	~ 20

Die Färbung zeigt allerdings neben den Banden in erwarteter Höhe, mehrere weitere Proteinbanden. Entweder konnten durch die Reinigung nicht alle Mediumproteine entfernt werden oder es handelt sich um Abbaubanden bzw. Aggregate. VlsE3 ist mit circa 12 kDa bedeutend zu kurz. Um die die Antigene im Elispot einzusetzen, benötigt man, um eine Zielkonzentration von 4µg/200µl pro Well zu erreichen, eine Konzentration von mindestens 80 µg/ml VlsE-Protein. Die erhaltenen Konzentrationen sind somit auch, nach Herstellung der rekombinanten Proteine im Baculosystem und anschließender Reinigung, zu niedrig. Die gereinigten Proteine wurden trotzdem versuchsweise im Elispot getestet.

4.5 Vergleich VLSE Vollantigen versus Teilantigen

Weder im Säugetierzellsystem mit HEK-293T-Zellen, noch im Insektenzellsystem mit Sf9-Zellen konnten die rekombinant hergestellten Fragmente stabil und vor allem in ausreichender Menge synthetisiert werden. Interessehalber wurden sie aber dennoch im Vergleich mit dem VlsE-Vollantigen im Elispot eingesetzt. Um nach Induktion der T-Zellen mit dem Antigen adäquate Spotzahlen zu erreichen wurden in mehreren Vorversuchen eine Antigenkonzentration von 4 µg/200µl ermittelt. Die maximale Menge an Antigenlösung kann dabei 50 µl betragen, um das Medium und damit die Nährstoffe und Puffersubstanzen der T-Zellen nicht zu stark zu verdünnen.

4.5.1 Elispot mit VlsE-Varianten aus HEK-293T-Zellen

Nachdem die Proteine im Säugetierzellsystem nur mit Konzentrationen kleiner als 20 µg/ml produziert werden konnten, setzte man sie zunächst ohne vorherige Aufreinigung als Antigen im Elispot ein. Die Proteine lagen im Zellkulturmedium DMEM vor. Die T-Zellen dreier Probanden wurden geprüft. Ein Proband, welcher in der hausinternen Studie serologisch, wie auch im Elispot negativ getestet wurde, ein Proband der serologisch negativ aber im Elispot mit VlsE positiv ausfiel und ein serologisch, sowie im Elispot positiver Proband. Die Ergebnisse deckten sich bezüglich der Antwort auf das VlsE-Vollantigen mit der vorangegangenen Studie. Eine adäquate Antwort auf die rekombinanten VlsE-Fragmente konnte dabei nicht erfasst werden.

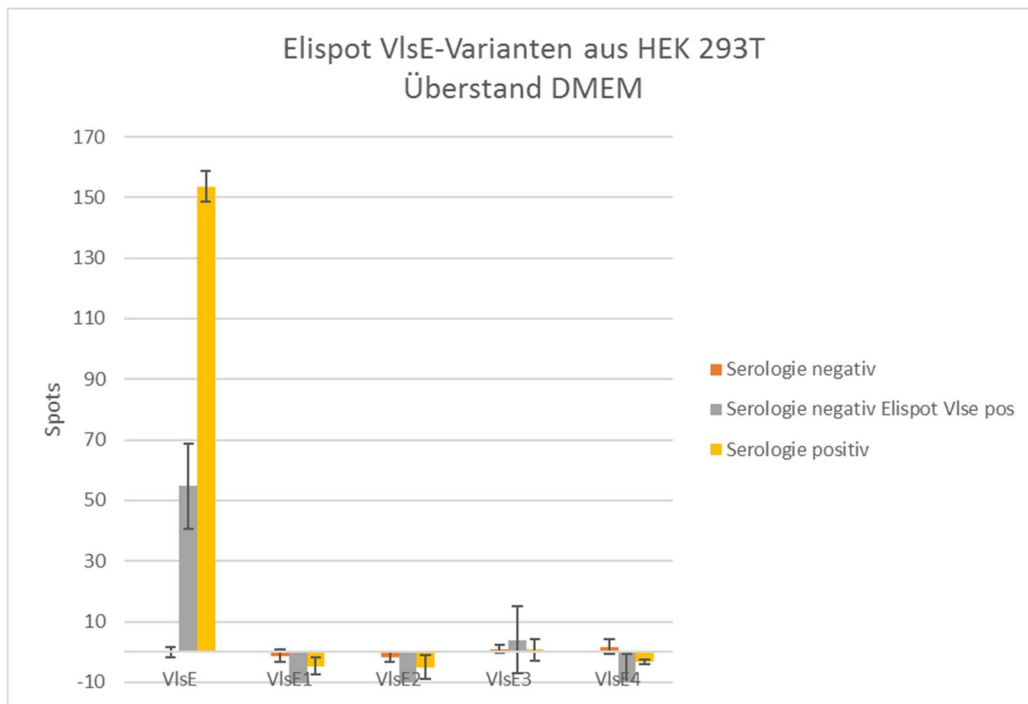


Abbildung 4.41: Elispot VlsE-Varianten aus HEK 293T – DMEM

Nachdem verschiedene weitere Versuche den Verdacht nahelegten, das Expressionsmedium DMEM selbst könnte die T-Zellen einzelner Probanden zur Interferonbildung induzieren, wurde eine zufällige Auswahl PBMC's von Diagnostikproben auf die Reaktivität der einzelnen Elispot-Testmedien geprüft.

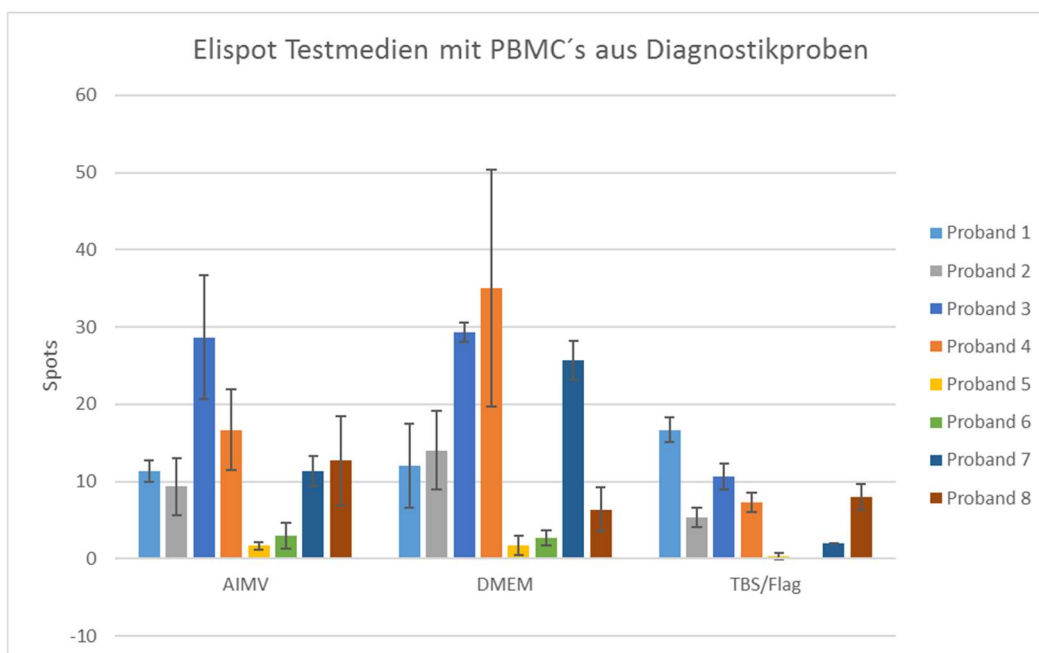


Abbildung 4.42: Elispot Medienvergleich

Die Ergebnisse des Medienvergleiches stellen sich folgendermaßen dar:

Deskriptive Statistik					
	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
AIMV	8	1,67	28,67	11,83	8,41
TBS-Flag	8	,00	16,67	6,29	5,67
DMEM	8	1,67	35,00	15,83	12,69
Gültige Werte (Listenweise)	8				

Test bei gepaarten Stichproben								
	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig.
			Standardfehler des Mittelwerts	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
	MW	STAW	s	Untere	Obere	T	df	Sig.
Paaren 1 AIMV - DMEM	-4,00	8,26	2,91	-10,9	2,9	-1,37	7	,21
Paaren 2 TBSFlag - AIMV	-5,54	6,86	2,43	-11,28	,19	-2,28	7	,056

Die Werte ergeben damit keinen statistisch signifikanten Einfluss des Mediums auf die Spotentwicklung. Da jedoch AIMV das empfohlene Medium für die Durchführung des Elispots ist, wurden die Proteine nach vorheriger Evaluation in AIMV exprimiert. Da sowohl unter Expression in DMEM, sowie in AIMV und nach Proteinreinigung keine ausreichende Konzentration der VlsE-Fragmente hergestellt werden konnte, wurde das Expressionssystem zu Insektenzellen gewechselt.

4.5.2 Elispot mit VlsE-Varianten aus Sf9-Zellen

Nachdem die VlsE-Fragmente mit Hilfe des Baculovirussystems und Insektenzellen hergestellt werden konnten, wurden die Überstände der Zellkultur, sowie die gereinigten Peptide im Elispot als Antigene eingesetzt. Allerdings waren auch hier die Konzentrationen niedriger als die erforderlichen 80 µg/ml. Als Probanden fungierten dabei, eine in der vorhergegangenen laborinternen Studie im Elispot positiv reagierende und eine negativ reagierende Testperson. Das VlsE-Gesamtantigen zeigt bei dem positiven Probanden eine starke Spotanzahl von 257

Spots. Die VlsE-Fragmente hingegen, sowohl im Überstand als auch nach der Reinigung, nur eine schwache Antwort zwischen drei und zehn Spots. Der Unterschied zwischen Überstand und gereinigten Proben ist dabei marginal. Der negative Proband fällt wie erwartet im Gesamt-VlsE und in den Varianten mit Werten zwischen null und drei nicht reaktiv aus.

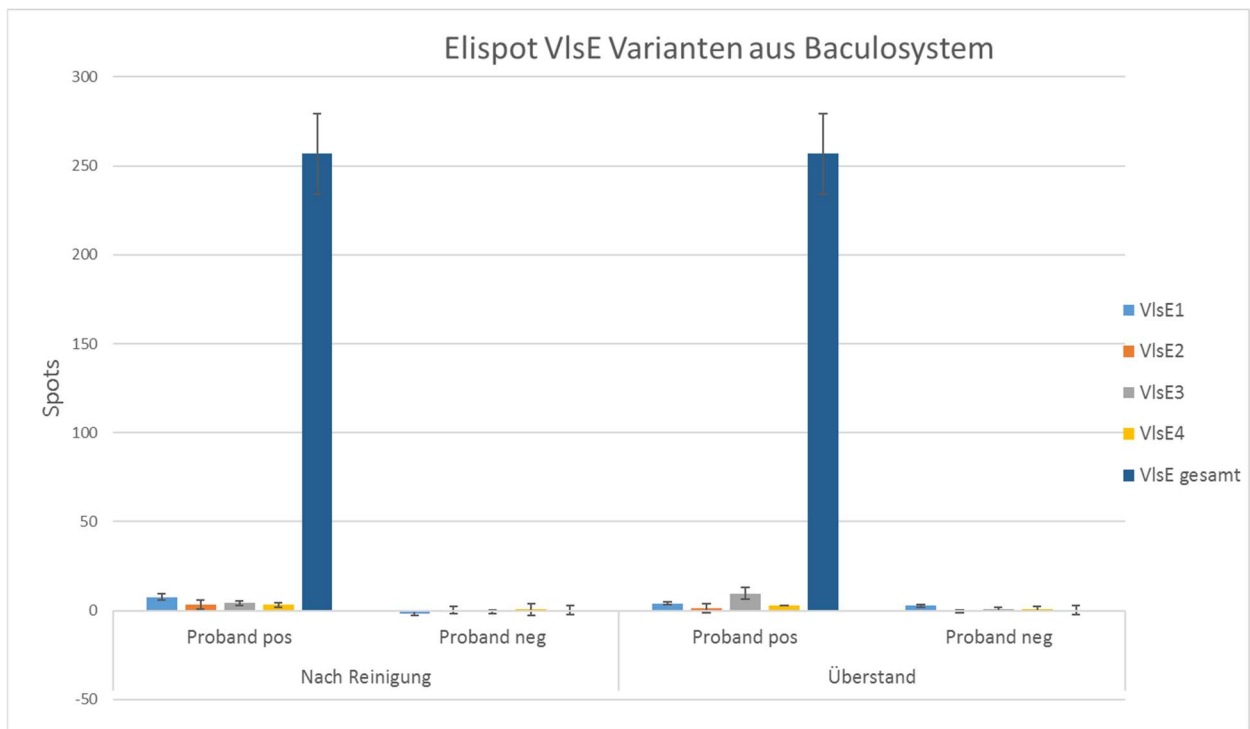


Abbildung 4.43: Elispot - VlsE-Varianten aus Baculosystem

5 Diskussion

5.1.1 Lyme Borreliose – ein diagnostisches Dilemma?

Die Lyme Borreliose, hervorgerufen durch verschiedene Spezies des *Borrelia burgdorferi sensu lato* Komplexes, ist die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung in Nordamerika und in den gemäßigten Klimazonen Eurasiens [53]. Die Krankheit zeigt klinisch ein außerordentlich variables Spektrum an Manifestationsformen. Diese reichen von der lokalisierten Form an der Haut, über verschiedene systemische Affektionen im Nervensystem, bis hin zu kardialen und rheumatischen Beschwerden. Aufgrund dieser Diversität im Symptomspektrum, erhält die Lyme Borreliose in vielen Fachdisziplinen einen wichtigen Stellenwert als mögliche Differentialdiagnose. Liegen vorwiegend unspezifische Krankheitszeichen vor, so kommt der Labordiagnostik immer mehr Gewicht zur Diagnosesicherung zu. Die momentan etablierten Methoden reichen vom direkten Erregernachweis im Dunkelfeld, Anzucht in speziellen Nährmedien, Nukleinsäurenachweis mittels PCR bis hin zur serologischen Nachweis spezifischer Antikörper gegen die verschiedenen Borrelienantigene. In der Routinediagnostik konnten sich allerdings wegen der langen Anzuchtdauer des Erregers und der geringen Erregerzahl im Untersuchungsmaterial nur die PCR und die Serologie durchsetzen. Die Kultur und Mikroskopie bleibt dabei speziellen Fragestellungen vorbehalten. Die Sensitivität der PCR ist allerdings abhängig vom Untersuchungsmaterial und dem gewählten Untersuchungsprotokoll. Aufgrund dessen und wegen der einfachen Probengewinnung setzte sich die Serologie als häufigstes Diagnostikum beim Verdacht auf eine Lyme Borreliose durch. Etabliert hatte sich dabei besonders der zweistufige Testansatz. Ein sehr sensitiver Suchtest, meist als ELISA aufgebaut, kombiniert mit einem spezifischerem Bestätigungstest, in der Regel ein Westernblot [105]. Ein positiver Nachweis im Westernblot bringt allerdings nicht den Beweis einer aktiven Borreliose. Je nach Expositionsrisiko schwankt die Serokonversion nach durchgemachter asymptomatischen Infektion zwischen 5 - 25 Prozent (siehe auch Kapitel 1). Da auch eine IgM-Persistenz bei der Lyme Borreliose keine Seltenheit ist, steht man vor dem Problem, keinen zuverlässigen Indikator für die Krankheitsaktivität im diagnostischen Repertoire zu besitzen [85]. Für die serologische Diagnostik zeigten sich viele Borrelienantigene als vielversprechende Ansatzpunkte. Auf das Flagellenantigen FlaB wurde man schon in frühen Studien als mögliche Zielstruktur

für Antikörper aufmerksam [116]. Die Antikörperantwort erfolgt schon bald nach der Infektion, allerdings zeigten sich auch Kreuzreaktivitäten mit verschiedenen Säugetiergeweben und anderen Bakterienantigenen [117]. Ein weiteres sehr immunogenes Oberflächenantigen ist OspC, welches erst exprimiert wird, wenn die Zecke am Säugetierwirt die Blutmahlzeit beginnt, während sich *Borrelia burgdorferi* sensu lato noch im Zeckendarm befindet. Unter den verschiedenen *Borrelia* Spezies ist OspC sehr heterogen. Nachdem eine konservierte immunogene Region des Proteins gefunden werden konnte, wurde ein synthetisches Peptid für den diagnostischen Einsatz produziert [105,118,119]. Die Antigene BmpA und DbpA sind ebenfalls immunogen, jedoch sollten für den diagnostischen Einsatz die jeweils regional ausgeprägten Sequenzen verwendet werden [105,120]. Antikörper gegen die Oberflächenantigene OspA und OspB scheinen eher im späteren Verlauf einer Infektion aufzutreten [121]. Erst vor circa zehn Jahren rückte ein weiteres Antigen in den Mittelpunkt des Interesses der Borreliosedagnostik und wurde dahingehend genauer untersucht und beschrieben. Es handelte sich um das Oberflächenantigen VlsE, ein Lipoprotein welches im Infektionsverlauf durch ständige Rekombinationen einer starken Antigenvariation unterliegt [44]. Als wichtiges Protein für die Immunevasion des Erregers ist es zugleich ein sehr immunogenes Antigen. Weitere Studien zeigten, dass eine hochkonservierte Region des VlsE-Proteins, die sogenannte C6-Region, eine starke Antikörperbildung induziert. Die Antikörper können im infizierten Organismus aber nicht an ihrer Zielstruktur binden, da es geschickt durch weitgehend variable Proteinanteile verdeckt wird. C6-Peptid konnte bereits erfolgreich als Antigen im Elisa eingesetzt werden [122]. Einige der Antigene, darunter auch VlsE, wurden in unserem Institut vergleichend bei 52 gesunden Probanden in der konventionellen Serologie zur Bestimmung von Antikörper und im Elispot zum Nachweis reaktiver spezifischer T-Zellen eingesetzt. Im Elispot zeigte sich dabei VlsE als bedeutendstes Antigen, welches bei einigen Probanden eine deutliche T-Zell-Reaktivität aufwies. 40% der serologisch IgG-positiven Probanden reagierten im Elispot mit einer Spotzahl größer 50. Im Hinblick darauf, dass die hohe Serokonversion ein großes Problem der etablierten Diagnostik ist, stellt sich hier die Frage, ob die Untersuchung der zellulären Antwort die Rate an fälschlich diagnostizierter Lyme Borreliose senken könnte.

Interessanterweise lag bei einem Probanden, welcher serologisch weder IgG noch IgM-Antikörper gegen Borrelien aufwies, eine starke T-Zell-Reaktivität gegen VlsE

vor. Der Proband zeigte aktuell keine Beschwerden und konnte sich auch nicht an einen Zeckenstich erinnern. Der Kreis Regensburg, das Einzugsgebiet der Probanden, gilt aber nach den Ergebnissen des ersten Meldejahres für Borreliosefälle als Hochrisikogebiet [21]. So, dass die Frage auch in die entgegengesetzte Richtung gestellt werden muss: Detektiert der Elispot serologisch negativ getestete Probanden? Dattwyler et al. kamen durch ihre Arbeit zu dem Schluss, dass bei chronischer Lyme Borreliose eine Dissoziation zwischen Antikörperantwort und T-Zell-Reaktivität auftreten kann [123]. Allerdings wurden hierbei keine einzelnen Antigene, sondern *Borrelia burgdorferi* Ganzzelllysate verwendet, weshalb die Spezifität der Ergebnisse, durch das Vorhandensein unspezifischer Mitogene, deutlich eingeschränkt ist. Aufgrund dieser Beobachtungen, sollte das Oberflächenantigen VlsE zu weiterführenden Untersuchungen im Elispot dienen. Eine, für die Zukunft aufschlussreiche Information stellt der Proteinanteil dar, welcher für die T-Zellantwort ursächlich ist. Diese Arbeit zielte darauf ab, vier Fragmente des VlsE-Proteins zu synthetisieren, um sie im Elispot einzeln und vergleichend einzusetzen. Die Zielstruktur des jeweiligen Fragments würde anschließend durch den Einsatz von Peptiden im Elispot möglichst genau ermittelt.

5.1.2 Rekombinante Synthese einzelner VlsE-Fragmente

Die Herstellung der Proteine erfolgte dabei rekombinant mittels Expression in der Zellkultur. Zwei verschiedene Systeme wurden hierfür angewandt. Das Säugetierzellsystem mit HEK 293T Zellen und ein System mit Sf9-Insektenzellen. Die HEK 293T Zellen eignen sich durch ihre etablierte Kultivierung und Transfektion, mit weitgehend stabiler Expression von eukaryotischer und prokaryotischer DNA zur Herstellung der rekombinanten Proteine [124]. Hierzu diente der starke CMV Promoter im Expressionsvektor, welcher eine „High Level Expression“ ermöglicht. Auch das Baculovirussystem, zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen, ist eine häufig verwendete und seit 1983 etablierte Methode [125]. Im System mit rekombinanten Baculoviren wird die hohe Expression der Proteine durch die Kontrolle des Zielgens unter dem „*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus Polyhydriinpromotor“ (p10) bewerkstelligt [115]. Eine Expression in der Zellkultur wurde gegenüber einer bakteriellen Expression bevorzugt, da bakterielle Bestandteile auch in geringsten Spuren eine zelluläre Antwort im Elispot

auslösen können und somit eine aufwändige Reinigung unabdingbar wäre. In der Säugetierzellkultur hingegen erschien zunächst der Versuch möglich, das Protein direkt aus dem Expressionsmedium einzusetzen.

Das durch die Firma Mikrogen bezogene VlsE Protein besteht aus den Sequenzen von *B. bavariensis* und *B. afzelii*. Liegt der immunogene Zielbereich der T-Zellen, ähnlich wie C6, über verschiedene Spezies hinweg konserviert vor, so sollten sich die VlsE Fragmente VlsE1 und VlsE3, sowie die Fragmente VlsE2 und VlsE4 weitgehend in der Auslösung der T-Zellantwort entsprechen [50]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die VlsE-Varianten in beiden Zellkultursystemen produziert werden, allerdings in zu geringer Konzentration, als diese anschließend zuverlässig im Elispot einsetzen zu können. Die Transfektionseffizienz und Infektionsraten wurden mikroskopisch geprüft und lagen im entsprechendem Bereich. So, dass die geringe Konzentration auf eine Instabilität des Proteins oder unzureichender Exkretion aus der Zelle zurückgeführt werden muss. In einer 2001 publizierten Untersuchung des VlsE-Proteins, welches rekombinant mit dem VlsE-Gen des Stammes *B. burgdorferi* B31 hergestellt wurde, konnten verschiedene physikochemische Eigenschaften ausgearbeitet werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die thermodynamische Stabilität für ein Protein dieser Größe eher gering ist [47]. In Kristallstrukturanalysen zeigte sich, dass sich vier VlsE Proteine zu einer asymmetrischen Quartärstruktur zusammenlegen, wobei die einzelnen Moleküle primär als Monomere in Lösung auftreten. Auf der Bakterienoberfläche treten sie aber wahrscheinlich als Dimer auf und verdecken durch diese Zusammenlagerung bestimmte invariable Regionen. Die Sekundärstruktur eines einzelnen Proteins besteht aus elf α -Helices und vier β -Faltblattabschnitten, was auf strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Oberflächenantigen OspC hinweist. Dabei bilden die Helices $\alpha 1$ bis $\alpha 3$ und $\alpha 11$ durch ihre räumliche Nähe zusammen den membranproximalen Teil des Proteins, während die Helices $\alpha 4$ bis $\alpha 10$ den distal der Bakterienmembran liegenden Teil bilden. Auch die kurzen β -Faltblattabschnitte befinden sich eher distal [46,47]. Der Temperaturmittelwert für die Proteinentfaltung liegt bei $55 \pm 1^\circ\text{C}$, bei einem pH-Wert von 7,0. Ab einem pH-Wert von kleiner 3 verliert das Proteine ebenfalls seine native Struktur und die thermodynamische Stabilität ist bei einem pH-Wert von größer als 10, im Vergleich zu 7, sehr stark reduziert [47]. Allerdings ist zu bedenken, dass es sich bei dem Protein um ein bestimmtes VlsE-Protein des *B. burgdorferi* Stammes B31 handelt. Dieses ist mit dem in dieser Arbeit verwandten VlsE-Protein nicht völlig identisch und

somit auch die physikochemischen Eigenschaften nicht komplett entsprechend. Für das rekombinante Protein der Firma Mikrogen gibt es bis dato noch keine Analysen in Hinblick auf die thermodynamische Stabilität. Auch wenn hierfür Daten vorliegen würden, wäre ein Vergleich mit den rekombinant hergestellten VlsE-Fragmenten schwierig, da es sich nur um Anteile des Vollproteins handelt. Neue Untersuchungen zeigen, dass das VlsE-Protein innerhalb der Zelle durch die hohe Konzentration makromolekularer Stoffe destabilisiert wird. Unterschiede zeigen sich auch zwischen den einzelnen Zellkompartimenten. Insbesondere im Zytosol scheint die Stabilität im Vergleich zu Nukleolus und endoplasmatischen Retikulum vermindert zu sein. Ob dies letztlich auch Auswirkungen auf das durch die Zelle nach extrazellulär sezerniertes VlsE hat, bleibt dabei jedoch unklar. Die Änderung der Proteinfaltung durch den Einfluss makromolekularer Umgebung ist dabei aber eher als reversibel zu betrachten. Im wasserhaltigen Puffer erreicht VlsE in diesen Untersuchungen die höchste Stabilität. [126–128].

Die synthetisierten VlsE-Fragmente zeigen ein zum Teil bis zu 25 Prozent höheres Molekulargewicht, als über die Aminosäuresequenz berechnet. Außerdem wurden häufig Doppelbanden beobachtet. Möglicherweise liegt dies begründet in der posttranslationalen Modifikation der Proteine, welche im Anschluss an die Proteinsynthese stattfindet. Es werden hierbei Veränderungen am Protein wahrgenommen. Manche Vorgänge finden direkt am Entstehungsort, weitere in anderen Zellorganellen oder teilweise auch erst extrazellulär statt. Zu den Modifikationen gehören zum Beispiel, die Abspaltungen bestimmter Aminosäuresequenzen oder das Anfügen von organischen oder anorganischen Gruppen an die Aminosäurereste. Die Doppelbanden könnten sich durch das simultane Vorliegen von postranslational modifizierten und nicht modifizierten Protein erklären.

5.1.3 Die Elispottechnologie und ihr möglicher Stellenwert in der Borreliosediagnostics

Die Vorgehensweise des Elispot-Verfahrens beschrieb zuerst Czerkinsky et al. 1983 in Schweden. Es wurde zum Nachweis von spezifischen Antikörper produzierenden Zellen, im Rahmen eines B-Elispots etabliert und basiert auf der schon länger bekannten Sandwich-ELISA-Technologie [129]. Dieses Grundprinzip wurde in verschiedene Richtungen weiterentwickelt, so dass damit eine Vielzahl von

sezernierten Zytokinen und Antikörper sowie im selben Zug auch die Anzahl der produzierenden Zellen erfasst werden kann. Das zu detektierende Zytokin wird nach Antigenstimulation der Immunzelle sezerniert und über spezifische Antikörper, welche am Reaktionsgefäß absorbiert wurden immobilisiert. Ein zweiter Detektionsantikörper, beispielsweise gekoppelt mit einem Enzym, bindet ebenfalls am Zytokin. Durch Zugabe von Substrat wird durch eine Farbstoffbildung die Anwesenheit des gesuchten Zytokins in Form von Spots sichtbar gemacht, wobei ein Spot letztendlich für eine Zytokin bildende Zelle spricht.

Das T-Zellsystem spielt im Hinblick auf Bekämpfung von Infektionen, Tumorkontrolle, Ausbildung allergischer Reaktionen oder Autoimmunkrankheiten eine wesentliche Rolle im Immunsystem. Durch den Einsatz einzelner Zelllinien mit antigenspezifischen Effektorzellen und Bildung verschiedenster Botenstoffe können ganz unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Immunantwort ergriffen werden. So haben manche Zellen die Möglichkeit, zytolytische Prozesse in Gang zu setzen oder klonal zu expandieren, beziehungsweise andere Subtypen dazu zu initiieren. Das Ziel der T-Zelldiagnostik ist es darzustellen, welche spezifische Zellantwort mit bestimmten klinischen Erscheinungen korreliert [130]. Der Elispot in dieser Arbeit dient dem Nachweis von Interferon- γ sezernierenden Zellen. Bei Interferon- γ handelt es sich um ein dimeres Glykoprotein, welches zur großen Gruppe der Zytokine gehört und der einzige Vertreter der Klasse II Interferone ist. Es ist ein wichtiges Molekül des angeborenen sowie erworbenen Immunsystems, zur Abwehr von Virusinfektionen, einigen bakteriellen Infektionen und Tumorwachstum. Es gehört zu den wichtigsten Aktivatoren für Makrophagen, induziert in allen Zellen eine MHC-I- sowie in Antigen präsentierenden Zellen, eine MHC-II-Hochregulation. Auch eine direkte antivirale Aktivität konnte nachgewiesen werden. Hauptsächlich wird Interferon- γ durch NK-Zellen und NKT-Zellen als Vertreter des angeborenen Immunsystems sowie von CD4 positiven TH1-Zellen und CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen als Bestandteile des erworbenen und spezifischen Immunsystems produziert [131,132]. Vereinfacht dargestellt sind die TH1-Zellen für intrazelluläre Erreger zuständig, während TH2-Zellen in der Bekämpfung extrazellulärer Erreger involviert sind. Im Falle einer Borrelieninfektion wird sowohl die zelluläre, als auch die humorale spezifische Immunantwort benötigt, um dieser suffizient zu begegnen [133]. Wie bereits Forsberg et al. zeigte, kann die spezifische T-Zellantwort, durch die Interferon- γ -Bildung der aktivierten TH1-Zellen im Elispot,

als mögliches Diagnostikum der Lyme-Borreliose genutzt werden [112]. Die Elispottechnologie ist die einzige Möglichkeit die sekretorische Aktivität bestimmter Zellen zu prüfen. Zur Charakterisierung von Zellen ist es zwar möglich die Flow-Zytometrie oder die intrazelluläre Zytokinfärbung zu nutzen, diese geben aber keinen Aufschluss darüber, ob auch tatsächlich eine Sekretion der Substanzen stattfindet [130]. Die Sensitivität des Elispots gegenüber einer Bestimmung der Zytokine mittels konventionellen Elisa ist aufgrund der unmittelbaren Immobilisierung des Zytokins durch den Antikörper um den Faktor 20 bis 200 größer [134]. Kombiniert man beide Techniken, wie Hagen et al. es 2012 publizierte, ist es auch möglich die im Mittel sezernierte Menge an Zytokin pro Zelle zu bestimmen [135]. Diese Information könnte insofern von Bedeutung sein, um eine länger zurückliegende Immunisierung, von einer akuten Infektion herrührenden T-Zell-Aktivität zu unterscheiden. So konnte Schlingmann et al. durch eine Untersuchung der Interferon- γ -Bildung in Abhängigkeit vom Impfstatus gegen Vacciniavirus zeigen, dass eine kürzliche Immunisierung mit einer gesteigerten Interferon- γ -Bildung pro Zelle einhergeht, welche Anhand der Spotgröße und Spotdichte quantifiziert wurde [136]. Genau diese Information wäre für die Diagnostik in den späten Stadien der Lyme Borreliose von großer Bedeutung.

5.1.4 Ausblick

Im Elispot, welcher mit den rekombinant hergestellten VlsE-Fragmenten im Vergleich zum VlsE-Komplettantigen von Mikrogen durchgeführt wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante Antwort auf eines der Fragmente erzeugt werden. Der Hauptgrund dafür dürfte die zu geringe Konzentration der Proteine sein. Um eine ausreichende Antwort auszulösen, sollte eine Konzentration der Proteinlösung von mindestens 80 $\mu\text{g/ml}$ vorliegen, welche aber weder durch das Zellkultursystem mit HEK 293T-Zellen noch durch das Baculovirussystem mit Sf9-Insektenzellen erreicht werden konnte. Die erreichten Konzentrationen betrugen dabei bestenfalls 75 % der Zielkonzentration für das VlsE1-Fragment, lediglich 6 % für VlsE2 und je 25% für VlsE3 und VlsE4. Zur Erhöhung der Ausbeute besteht die Möglichkeit in weiterführenden Arbeiten andere Expressionssysteme zu verwenden. Hierfür könnte man beispielsweise Hefen als weiteres eukaryotisches oder *Escherichia coli* als prokaryotisches Expressionssystem versuchen. Auch auf Seiten der Proteinreinigung wären weitere Variationen möglich. Beispielsweise eine strikte Temperatureinhaltung

von +3°C, um insbesondere instabile Proteine schonend zu reinigen und zu konzentrieren. Eine weitere Möglichkeit stellen verschiedene Proteaseinhibitoren dar, welche kommerziell erhältlich sind und dem synthetisierten Protein so früh wie möglich zugegeben werden sollten, um dessen enzymatischen Abbau zu verhindern. Auch der Zusatz von proteinstabilisierenden Substanzen wie Trehalose, Saccharose oder Polyalkohole wäre denkbar. Insbesondere Trehalose scheint protektiv gegen eine Destabilisierung der Proteinstruktur zu wirken. Verschiedene Einzeller produzieren Trehalose, wenn sie irgendeiner Form von Stress ausgesetzt sind, um ihre zelluläre Integrität zu schützen [137]. Ebenso wäre es möglich, für die weitere Untersuchung der T-Zellantwort auf das VlsE-Borrelienantigen im Elispot, Bibliotheken überlappender Peptide zur Identifikation des immunogenen Epitopes verwendet werden. Da die T-Zellen nur prozessierte Antigene zusammen mit MHC erkennen können, ist die Art des eingesetzten Antigens ausschlaggebend und die Anwesenheit von APC's im Testansatz erforderlich. Werden lösliche Antigene im Test mit PBMC's eingesetzt, werden sie den CD4-positiven T-Zellen durch die APC's auf MHC-II, bzw. den CD8-positiven Zellen auf MHC-I präsentiert und fungieren so als aktivierender Ligand. Als APC's dienen in den PBMC's der Patientenproben meist ruhende B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen [138]. Sercarz et al. deuten darauf hin, dass bei einer Infektion die Populationen der APC's in den verschiedenen Kompartimenten des Organismus unterschiedlich zusammengesetzt sein können [139]. Abhängig von der APC werden nur bestimmte Bereiche des Antigens präsentiert. So könnte es dazu führen, dass Peptide die im Entzündungsbereich durch eine Population von APC's präsentiert werden, im Testansatz mit Proteinantigen durch die PBMC's nicht in derselben Weise präsentiert werden und dadurch keine Aktivierung der T-Zellen ausgelöst wird. Verwendet man stattdessen Peptidantigene in angemessenen Längen, kann der Test unabhängig solcher prozessierungsbedingter Unterschiede erfolgen, da die Peptide direkt auf MHC II binden können. Benutzt man zudem systematische Peptidbibliotheken können den T-Zellen alle potentiellen Epitope des Kompletantigens präsentiert werden [138]. Die korrekte Auswahl der Peptidlänge ist wichtig, da MHC I Peptide nur bis zu einer maximalen Länge von zehn Aminosäuren aufnimmt, während MHC II Peptide von 12 bis 25 Aminosäuren Länge präsentiert. Peptide aus acht bis zehn Aminosäuren stimulieren deshalb CD4-Zellen weniger stark, als solche die länger als 12 Aminosäuren sind. So sollten in weiterführenden

Arbeiten für das CD4-Mapping von VlsE, Peptide mit 12 bis 15 Aminosäuren Länge und einer Überlappung von drei bis vier Aminosäuren verwendet werden [138,140].

6 Zusammenfassung

Die Lyme Borreliose ist eine bakterielle Infektionskrankheit, welche durch die Spirochäte *B. burgdorferi sensu lato* verursacht und über den Stich infizierter Zecken auf den Menschen übertragen wird. Während die Infektion in frühen Stadien klinisch gut diagnostiziert werden kann, zeigt sich die Erkrankung in den späteren Stadien mit unterschiedlichen Symptomen, was die klinische Diagnose deutlich erschwert. Die bisher am weitesten verbreitete Labordiagnostik, um die klinische Diagnose zu sichern, ist der Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Borrelia*. In der Regel wird hierzu ein zweistufiges Prinzip angewandt, bei welchem zunächst ein sensitiver Suchtest - meist ein ELISA- und zur Bestätigung ein spezifischer Test, häufig in Form eines Westernblots eingesetzt wird. Gerade in den späteren Stadien ist ein positiver serologischer Testausfall, durch die hohe Durchseuchungsrate in Endemiegebieten, oft wenig aussagekräftig. Es ist deshalb wünschenswert, eine weitere diagnostische Methode mit präziserer Aussage zur Krankheitsaktivität zu etablieren. Die spezifische T-Zell-Immunität gegen *B. burgdorferi* wurde bisher nur unzureichend untersucht. Da hoch sensitive und spezifische Tests zur Analyse der T-Zell-Antwort noch fehlen. Ein bereits erfolgreich in der Tuberkulosedagnostik angewandtes Verfahren, welches den Nachweis von erregerspezifischen Interferon- γ produzierenden T-Zellen erlaubt, stellt der Elispot dar. In meinen Untersuchungen wurde das Oberflächenantigen VlsE als mögliches Antigen für den Einsatz im Elispot identifiziert und zum Nachweis *Borrelia*-spezifischer T Zellen von Probanden erfolgreich eingesetzt. Vier Fragmente dieses Antigens sollten deshalb im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt werden, um es im Anschluss für eine weitere Feinkartierung des Epitopes vergleichend im Elispot einzusetzen. Hierzu wurden die rekombinanten Antigene in Plasmidvektoren kloniert und mittels Sequenzierung auf dessen Richtigkeit erfolgreich überprüft. Nach Synthese der Proteine durch HEK 293T Zellen konnten diese mittels Westernblot, Elisa und weiteren Proteinfärbungen analysiert werden. Nachdem die hergestellte Proteinmenge für einen Einsatz im Elispot nicht ausreichend war, wurde auf Baculoviren als Expressionssystem gewechselt. Es gelang die Klonierung und Herstellung rekombinanter Baculoviren, sowie die Expression der Proteine und deren Nachweis und Aufreinigung. Versuche im Elispot zeigten, dass die weitere Expressionsoptimierung erforderlich ist, um mit ausreichend hohen Antigenmengen reproduzierbare T Zell Elispot-Tests

durchzuführen und für den Einsatz in der Routinediagnostik der Lyme Borreliose zu validieren.

7 Anhang

7.1 VlsE-Varianten DNA- und Aminosäuresequenzen

VlsE1:

SacI XhoI BclI

1 CGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCTCGAGATGATCAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTTAACCGCCTTCCGGCAGTTCCGGTGCACAGAACAGGTCTCGAGGAGCTCTACTAGTG
M I T

61 CAACAGCCGGGGCAGCGTGGACATGAAGGACAATGTGGGCGGCGACGACAAGAAGGACAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGTGCGCCCCGTGCGACCTGTACTTCTGTACACCCGCCGCTGCTGTTCTTCCTGTG
 N S R G S V D M K D N V G G D D K K D T

121 CGCCGCCAGCATCTTCTACCAGAGCATCATCAACCTGGGCAACGGCTTCATCGAGGTGTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGGCGGTTCGTAGAAGATGGTCTCGTAGTAGTTGGACCCGTTGCCGAAGTAGCTCCACAA
 A A S I F Y Q S I I N L G N G F I E V F

181 CAACGCCTTCAGCGGCCTGGACGCCGACGCCTTTTCTAAGGCCGACCCCAAGAAAAGCGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGCAGGAAGTCGCCGGACCTGCGGCTGCGGAAAAGATTCCGGCTGGGGTTCTTTTCGCT
 N A F S G L D A D A F S K A D P K K S D

241 CGTGAACCTTACTTTCGACAGCATCACCAAGACCCTGAAGGATACCAAGACCAAGCTGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCACTTTTGGATGAAGCTGTCTGTAGTGGTTCTGGGACTTCCTATGGTTCTGGTTCGACCT
 V K T Y F D S I T K T L K D T K T K L E

EcoRV

301 AGATATCAGCAAAGAGAAAAACAGGCGGCGAGAAAACCCCTGCCGTGGAAGGCATTGCCGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCTATAGTCGTTTCTCTTTTGTCCGCCGCTCTTTTGGGGACGGCACCTTCCGTAACGGCT
 D I S K E K T G G E K T P A V E G I A E

PstI

361 GGTCGTGAAAAACAGTGGGCGAGTGGCTGGACGGCCTGATTAAGGCTGCAGAGGGCGGAGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCAGCACTTTTGTACCCGCTCACCGACCTGCCGGAATAATCCGACGTCTCCCGCCTCC
 V V K T V G E W L D G L I K A A E G G G

421 CAAAGCCGCCGATGGCGGAGGCTCTGACAAGATCGGAAATGTGGCTGCCGGCGGAGGCGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTTCGGCGGCTACCGCCTCCGAGACTGTTCTAGCCTTTACACCGACGGCCGCTCCGCG
 K A A D G G G S D K I G N V A A G G G A

NarI Kasi *NarI Kasi*

481 TGGCGCCGACAAAGAATCCGTGAACGGAATCGCAGGCGCCATCAAGGGCATCGTGGAAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACCGCGGCTGTTTCTTAGGCACTTGCTTAGCGTCCGCGGTAGTTCCCGTAGCACCTTCG
 G A D K E S V N G I A G A I K G I V E A

541 CGCCAAGAAAGTGGAAAGGCGTGAAGTTCGCCCCCAAGGCCGCTGCTGATGCCGCCGCTGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGGTTCTTTACCTTCCGCACTTCAAGCGGGGGTTCCGGCGACGACTACGGCGGCGACT
 A K K V E G V K F A P K A A A D A A A D

XbaI KpnI

601 CTACAAGGACGACGACGATAAGTGATAATCTAGAGGTACCTGGAGCACAAGACTGGCCTC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GATGTTCTGCTGCTGCTATTCACTATTAGATCTCCATGGACCTCGTGTTCTGACCGGAG
 Y K D D D D K * *
 ATGGGCCTTCCGCTCACTGC
 661 -----+-----+
 TACCCGGAAGGCGAGTGACG

VlsE2:

BssHII
AvrII
StuI *AscI* *SacI* *XhoI*

1 GGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCATGAGCTCCTCGAGGAAGGCCGT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCGCTTAACCGCCTTCCGGCAGTTCCGGATCCGCGCGGTACTCGAGGAGCTCCTTCCGCA
E G V

61 GAAGTTCGCCCCCTAAGGCCGCTGCCGATGCCGCTGCTGCTGACGGAAACAAGAAGGCCGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTCAAGCGGGGATTCGGGCGACGGCTACGGCGACGACGACTGCCTTTGTTCTTCCGGCC
 K F A P K A A A D A A A A D G N K K A G

PvuII
PstI

121 CAAGCTGTTTCGGCACAGCCGCTGGCGCTGATGCCGGCGACGTGAAAGATGCTGCTGCAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTCGACAAGCCGTGTCGGGCGACCGCGACTACGGCCGCTGCACTTTCTACGACGACGCTCG
 K L F G T A A G A D A G D V K D A A A A

181 TGTGGGAGCCGTGTCCGGCGAGCAGATCCTGAATGCCATCGTGACAGCCGCCGGACAGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACACCCTCGGCACAGGCCGCTCGTCTAGGACTTACGGTAGCACTGTCGGCGGCCTGTCCG
 V G A V S G E Q I L N A I V T A A G Q A

241 AGGACAGGCCCGAAAGAAAGCCGACGAGGCCAAGAACGCCATCGAGGCCGCTATTGGAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCCTGTCCGGCCTTTCTTTCGGCTGCTCCGGTTCTTGCGGTAGCTCCGGCGATAACCTCG
 G Q A G K K A D E A K N A I E A A I G A

301 TGCTGGCGACGCCGATTTTCGGGCGACGACATCAAGAAGAAGAACGACCAGATCGCCGCTGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACGACCGCTGCGGCTAAAGCCGCTGCTGTAGTTCTTCTTCTTGCTGGTCTAGCGGCGACG
 A G D A D F G D D I K K K N D Q I A A A

361 CCTGGTGCTGAGAGGCGTGCCCAAGGATGGCAAGTTCGCCGTGAAGCGGAGCATGAAGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACCACGACTCTCCGCACCGGTTCTTACCGTTCAAGCGGCACTTCGCCTCGTACTTCTT
 L V L R G V A K D G K F A V K R S M K N

421 CAACGCCGTGGGCAAGGGCAACGACGACAAGGACAGCGTGAAAACCTTCTACGAGAGCAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGGCGGCACCCGTTCCCGTTGCTGCTGCTTCTCTGTCGCACTTTTGGAGATGCTCTCGTA
 N A V G K G N D D K D S V K T F Y E S I

481 CATCAACCTGGGCAACGGCTTCATCGACGTGTTCAACGCCTTCAGCGGCCTGGTGGCCGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTAGTTGGACCCGTTGCCGAAGTAGCTGCACAAGTTGCGGAAGTCGCCGGACCAACCGGCT
 I N L G N G F I D V F N A F S G L V A D

541 CACCTTCTTCAAGAGCGACCCCAAGAAATCCGATGTGAAAACCGACTACAAGGACGACGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGAAGAAGTTCTCGCTGGGGTTCTTTAGGCTACACTTTTGGCTGATGTTCTGCTGCT
 T F F K S D P K K S D V K T D Y K D D D

XbaI *KpnI* *PacI*

601 CGATAAGTGATAATCTAGAGGTACCTCTTAATTAACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTATTCACTATTAGATCTCCATGGAGAATTAATTGACCGGAGTACCCGGAAGGCGAGTG
 D K * * *

661 TGCCC

 ACGGG

VlsE3:

SacI XhoI

1 CGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCTCGAGGACACCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTTAACCGCCTTCCGGCAGTTCCGGTGCACAGAACAGGTCTCGAGGAGCTCCTGTGGAA
D__T__F__

61 CTTCAAGAGCGACCCCAAGAAAAGCGACGTGAAAACCTACTTCGAGAGCATCAGCAGCAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAAGTTCTCGCTGGGGTTCTTTTCGCTGCACTTTTGGATGAAGCTCTCGTAGTCGTCGTG
 F__K__S__D__P__K__K__S__D__V__K__T__Y__F__E__S__I__S__S__T__

121 CCTGAAGGCCACCAAGGGCAAGCTGGACGAGCTGGTGTCTGCCAAGAAGGGCGAGGGCGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACTTCCGGTGGTTCCTCGTTCGACCTGCTCGACCACAGACGGTTCTTCCCGCTCCCGCC
 L__K__A__T__K__G__K__L__D__E__L__V__S__A__K__K__G__E__G__G__

BclI

181 AAGCGTGAAGGCCAGCGTGAAAAGCGCCGTGGACGAGGTGTCCAAGTGGCTGGAAGAGAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCGCACTTCCGGTTCGCACTTTTCGCGGCACCTGCTCCACAGGTTACCGACCTTCTCTA
 S__V__K__A__S__V__K__S__A__V__D__E__V__S__K__W__L__E__E__M__

241 GATCAAGGCCGCCGAGGACGCCGCCACAAAAGGCGGAACAGGCGGAGCCGATAAGATCGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTAGTTCGGCGGCTCCTGCGGCGGTGTTTTCCGCCTTGTCGCGCTCGGCTATTCTAGCC
 I__K__A__A__E__D__A__A__T__K__G__G__T__G__G__A__D__K__I__G__

BclI

301 CGACGTGGGAGCTGATCATGCCGGCGCTGTGGCCGATGAGAGCAGCGTGAACGGAATCGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTGCACCCTCGACTAGTACGGCCGCGACACCGGCTACTCTCGTCGCACTTGCCTTAGCG
 D__V__G__A__D__H__A__G__A__V__A__D__E__S__S__V__N__G__I__A__

361 CAAGGGCATCAAGGGAATCGTGGCCGCTGCCGGAAGGCCCTGGGAAAAGATGGCGACGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTCCCGTAGTTCCCTTAGCACCGGCGACGGCCTTTCCGGGACCCTTTTCTACCGCTGCG
 K__G__I__K__G__I__V__A__A__A__G__K__A__L__G__K__D__G__D__A__

421 CCTGAAGGGCGTGACAGCCGCTGATGGCGAAGCCAATGCCGTGGCCGGAAGCTGTTTGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACTTCCCGCACTGTGCGGCGACTACCGCTTCGGTTACGGCACCGGCCTTTCGACAAACG
 L__K__G__V__T__A__A__D__G__E__A__N__A__V__A__G__K__L__F__A__

PvuII

481 CACAGGCGCTGGCGCTAACGCCGTGGCTGGCGATATTGCCAAAGCCGCGAGCTGCTGTGAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGTCCGCGACCGCGATTGCGGCACCGACCGCTATAACGGTTTCGGCGTCGACGACACTG
 T__G__A__G__A__N__A__V__A__G__D__I__A__K__A__A__A__A__V__T__

541 CGCCGTGTCCATCGTGGATGCTGCCGGCGACAAGGACCAGGACGGCATGGACTACAAGGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCGGCACAGGTAGCACCTACGACGGCCGCTGTTTCTGCTCCTGCCGTACCTGATGTTCTCCT
 A__V__S__I__V__D__A__A__G__D__K__D__Q__D__G__M__D__Y__K__D__

XbaI KpnI

601 CGACGACGACAAGTGATAATCTAGAGGTACCTGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTGCTGCTGTTCCTACTATTAGATCTCCATGGACCTCGTGTTCTGACCGGAGTACCCGGAA
 D__D__D__K__*__*__

661 CCGCTCACTGC
 -----+-----
 GGCGACTGACG

7.2 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: Die globale Verbreitung von Ixodes-Zecken die <i>B. burgdorferi</i> beinhalten [15]	3
Abbildung 1.2: Inzidenzkarte der Lyme Borreliose in Bayern [21]	4
Abbildung 1.3: Die Rekombination im VlsE-Gen [44]	9
Abbildung 1.4: Aufbau von vlsE, Variable (VR) und Invariable (IR) Regionen [46]	10
Abbildung 1.5: Die weltweite Verteilung der Vektoren der Lyme Borreliose [53]	11
Abbildung 1.6: Diagnostischer Algorithmus der Borrelien-Serologie [85]	23
Abbildung 3.1: Leucosep-Röhrchen vor Zentrifugation (Fa. Oxford Immunotec)	43
Abbildung 3.2: Nach Zentrifugation finden sich die PBMC's als wolkige Schicht auf dem Ficoll (Fa. Oxford Immunotec)	43
Abbildung 3.7: Vektorkarte des pMA-T-Plasmids mit VlsE1-Fragment	49
Abbildung 3.8: Vektorkarte des pMA-Plasmids mit VlsE2-Fragment	50
Abbildung 3.9: Vektorkarte des pMA-T-Plasmids mit VlsE3-Fragment	50
Abbildung 3.10: Vektorkarte des pMK-RQ-Bb-Plasmids mit VlsE3-Fragment	51
Abbildung 3.11: Nachweis des Zielgens in der rekombinanten Bacmid-DNA [115]	61
Abbildung 4.1: Die elektrophoretische Auftrennung der GeneArt-Klonierungsvektoren und dem pCR.3 Expressionsvektor nach Verdau mit XhoI und XbaI.	70
Abbildung 4.2: Elektrophoretische Auftrennung der Proben nach der Gelextraktion. Es findet sich jeweils nur eine Bande im erwarteten Kb-Bereich.	72
Abbildung 4.3: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE1-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.	72
Abbildung 4.4: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE2-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.	73
Abbildung 4.5: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE3-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.	73
Abbildung 4.6: Die elektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pCR.3 mit VlsE4-Insert, verdaut mit XhoI und XbaI. Die Plasmide der geprüften Klone sind identisch und beinhalten das Zielgen.	74
Abbildung 4.7: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in DMEM gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde DMEM als Expressionsmedium zugegeben.	75
Abbildung 4.8: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in DMEM/AIMV gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde DMEM/AIMV als Expressionsmedium zugegeben.	75
Abbildung 4.9: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in DMEM/AIMV gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde AIMV als Expressionsmedium zugegeben.	76
Abbildung 4.10: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme (200x). Zellen wurden in AIMV gehalten und ausgesät. Nach der Transfektion wurde AIMV als Expressionsmedium zugegeben.	76
Abbildung 4.11: Westernblot zum Expressionsnachweis der einzelnen VlsE-Fragmente nach Transfektion mit DMEM als Anzucht und Expressionsmedium.	78
Abbildung 4.12: Westernblot zum Expressionsnachweis der einzelnen VlsE-Fragmente nach Transfektion mit DMEM/AIMV als Anzuchtmedium und AIMV als Expressionsmedium.	78
Abbildung 4.13: Kolloidale Commassie-Färbung nach Kang der Proben nach der Proteinreinigung.	82
Abbildung 4.14: Einfügen einer EcoRI-Schnittstelle, Nachweis der PCR-Produkte	83
Abbildung 4.15: Verdau mit EcoRI und XbaI	84
Abbildung 4.16: Verdau des Ligationsansatzes VlsE-Fragment/pFastBac	85
Abbildung 4.17: PCR zum Nachweis des Zielgens der VlsE-Varianten in der Bacmid-DNA	86
Abbildung 4.18: Wachstumskontrolle Sf9-Zellen nach 24h	87
Abbildung 4.19: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 24h	88
Abbildung 4.20: VlsE Varianten 1-4 nach 24h	88
Abbildung 4.21: Wachstumskontrolle sf9-Zellen nach 48h	89
Abbildung 4.22: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 48h	89
Abbildung 4.23: VlsE Varianten 1-4 nach 48h	90
Abbildung 4.24: Wachstumskontrolle sf9-Zellen nach 72h	90
Abbildung 4.25: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 72h	91
Abbildung 4.26: VlsE-Varianten 1-4 nach 72h	91
Abbildung 4.27: Wachstumskontrolle sf9-Zellen nach 96h	92
Abbildung 4.28: Gfp-Kontrolle in Phasenkontrast und Fluoreszenz nach 96h	92
Abbildung 4.29: VlsE-Varianten 1-4 nach 96h	93

Abbildung 4.30: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE1 im Time Course	94
Abbildung 4.31: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE2 im Time Course	95
Abbildung 4.32: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE3 im Time Course	95
Abbildung 4.33: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE4 im Time Course	96
Abbildung 4.34: Silberfärbung Sf9-Zellkulturüberstand VlsE0 im Time Course	97
Abbildung 4.35: Dotblot mit anti-Flag	98
Abbildung 4.36: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE1	99
Abbildung 4.37: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE2	100
Abbildung 4.38: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE3	101
Abbildung 4.39: Westernblot mit anti-Flag, Zellkulturüberstand VlsE4	102
Abbildung 4.40: Silberfärbung nach Proteinreinigung	103
Abbildung 4.41: Elispot VlsE-Varianten aus HEK 293T – DMEM	105
Abbildung 4.42: Elispot Medienvergleich	105
Abbildung 4.43: Elispot - VlsE-Varianten aus Baculosystem	107

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb. – Abbildung

ACA – Acrodermatitis chronica atrophicans

ALP – alkalische Phosphatase

B. – Borrelia

Bp – Basenpaare

Bpi – Bactericidal permeability increasing protein

BSA – Bovine serum albumine

Bzw. – beziehungsweise

Ca. - circa

CD – Cluster of Differentiation

CRASP – Complement regulator acquiring surface protein

DMSO – Dimethylsulfoxid

Dpb – Decorin binding protein

ECM – Erythema chronicum migrans

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA – Enzyme linked immuno assay

Elispot – Enzyme linked immuno spot

FCS – fetales Kälberserum

HBS – Hepes buffered saline

HEK – Human embryonic kidney

HRP – Horesradish peroxidase

IR – Invariable Region

oD – optische Dichte

oD600 – optische Dichte bei 600 nm

Osp – Outer surface antigen

PBMC – Peripheral blood mononuclear cell

PCR – Polymerase chain Reaction

PMA – Phorbol 12-myristate 13-acetat

PRR – Pattern recognition receptor

PVDF – Polyvinylidenfluorid

Rpm – Revolutions per minute

RT – Raumtemperatur

SDS – Sodiumdodecylsulfat

STAW – Standardabweichung

TAE – Tris acetat EDTA

TBS – Tris-buffered saline

TFB – Transformation buffer

TLR – Toll like Rezeptor

TRIS – Trishydroxymethylaminomethan

TTBS – Tris-buffered saline mit Tween20

u.a. – unter anderem

VlsE – Variable major protein like sequence, Expressed

Vmp – variable major protein

VR – Variable Region

WB – Westernblot

z.B. – zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

1. Recommendations for Test Performance and Interpretation From the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *JAMA*. 1995;274(12):937. doi:10.1001/jama.1995.03530120023018
2. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: Mit 157 Tabellen. 6th ed. Heidelberg: Springer; 2009. XXIV, 890 S. (Springer-Lehrbuch).
3. Aberer E, Brunner C, Suchanek G, Klade H, Barbour A, Stanek G, Lassmann H. Molecular mimicry and Lyme borreliosis: a shared antigenic determinant between *Borrelia burgdorferi* and human tissue. *Ann Neurol*. 1989;26(6):732–7. doi:10.1002/ana.410260608
4. Aberer E. What should one do in case of a tick bite? *Curr. Probl. Dermatol*. 2009;37155–66. eng. doi:10.1159/000213073
5. Ackermann R, Kabatzki J, Boisten HP, Steere AC, Grodzicki RL, Hartung S, Runne U. *Ixodes ricinus* spirochete and European erythema chronicum migrans disease. *Yale J Biol Med*. 1984;57(4):573–80. eng.
6. Afzelius A. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. *Arch Dermatol Syphilol*. 1910;101104.
7. Afzelius A. Erythema chronicum migrans. 1921;(2):120–5.
8. Agüero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, Bittker S, Cooper D, Nadelman RB, Wormser GP. Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 1996 [cited 2015 Mar 16];34(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228718/>
9. Agüero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, McKenna DF, Carbonaro CA, Wormser GP. Serodiagnosis in early Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(12):3090–5.
10. Agüero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005;18(3):484–509. eng. doi:10.1128/CMR.18.3.484-509.2005
11. Agüero-Rosenfeld ME, Wormser GP. Lyme disease: diagnostic issues and controversies. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2015;15(1):1–4. eng. doi:10.1586/14737159.2015.989837
12. Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC. The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild and brief arthritis. *Infect. Immun*. 1999;67(1):173–81.
13. Alt FW, editor. *Advances in immunology: Volume 96*. New York, N.Y: Academic Press; 2007. 215 p. (Advances in Immunology; vol. 96). eng.
14. Anthony DD, Lehmann PV. T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. *Methods*. 2003;29(3):260–9.
15. Anzola J, Luft BJ, Gorgone G, Dattwyler RJ, Soderberg C, Lahesmaa R, Peltz G. *Borrelia burgdorferi* HSP70 homolog: characterization of an immunoreactive stress protein. *Infect. Immun*. 1992;60(9):3704–13. eng.
16. Asbrink E, Hederstedt B, Hovmark A. The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans Afzelius. *Acta Derm. Venereol*. 1984;64(4):291–5. eng.
17. Asbrink E, Hovmark A, Hederstedt B. Serologic studies of erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Acta Derm. Venereol*. 1985;65(6):509–14. eng.
18. Asbrink E, Hovmark A, Weber K. Acrodermatitis Chronica Atrophicans. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 193–204.
19. Asbrink E, Olsson I. Clinical manifestations of erythema chronicum migrans Afzelius in 161 patients. A comparison with Lyme disease. *Acta Derm. Venereol*. 1985;65(1):43–52. eng.
20. Åsbrink E, Hovmark A. Cutaneous Manifestations in Ixodes-borne *Borrelia Spirochetosis*. *Int J Dermatol*. 1987;26(4):215–23. doi:10.1111/j.1365-4362.1987.tb00902.x
21. Auwaerter PG, Bakken JS, Dattwyler RJ, Dumler JS, Halperin JJ, McSweeney E, Nadelman RB, O'Connell S, Shapiro ED, Sood SK, Steere AC, Weinstein A, Wormser GP. Antiscience and ethical concerns associated with advocacy of Lyme disease. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(9):713–9. eng. doi:10.1016/S1473-3099(11)70034-2
22. Baker PJ. Perspectives on \"chronic Lyme disease\". *Am. J. Med*. 2008;121(7):562–4. eng. doi:10.1016/j.amjmed.2008.02.013

23. Baranton G, De Martino, Sylvie J. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;371–17. eng. doi:10.1159/000213066
24. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med.* 1984;57(4):521–5. eng.
25. Barbour AG. Linear DNA of *Borrelia* species and antigenic variation. *Trends Microbiol.* 1993;1(6):236–9. eng.
26. Barbour AG, Burgdorfer W, Grunwaldt E, Steere AC. Antibodies of patients with Lyme disease to components of the *Ixodes dammini* spirochete. *J. Clin. Invest.* 1983;72(2):504–15. eng.
27. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 1986;50(4):381–400. eng.
28. Barbour AG, Heiland RA, Howe TR. Heterogeneity of Major Proteins in Lyme Disease *Borreliae*: A Molecular Analysis of North American and European Isolates. *Journal of Infectious Diseases.* 1985;152(3):478–84. doi:10.1093/infdis/152.3.478
29. Bauer Y, Hofmann H, Jahraus O, Mytilineos J, Simon MM, Wallich R. Prominent T cell response to a selectively in vivo expressed *Borrelia burgdorferi* outer surface protein (pG) in patients with Lyme disease. *Eur. J. Immunol.* 2001;31(3):767–76. eng. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<767::AID-IMMU767>3.0.CO;2-M
30. Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelman R, Kaslow RA. Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 1983;308(13):740–2. eng. doi:10.1056/NEJM198303313081302
31. Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringér A, Elmrud H, Carlsson M, Runeheggen A, Svanborg C, Norrby R. An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N. Engl. J. Med.* 1995;333(20):1319–27. eng. doi:10.1056/NEJM199511163332004
32. Bergström S, Bundoc VG, Barbour AG. Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 1989;3(4):479–86. doi:10.1111/j.1365-2958.1989.tb00194.x
33. Berndtson K. Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *Int J Gen Med.* 2013;6291–306. eng. doi:10.2147/IJGM.S44114
34. Bhate C, Schwartz RA. Lyme disease: Part I. Advances and perspectives. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011;64(4):619. eng. doi:10.1016/j.jaad.2010.03.046
35. Bhate C, Schwartz RA. Lyme disease: Part II. Management and prevention. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011;64(4):639. eng. doi:10.1016/j.jaad.2010.03.047
36. Binder K, Reich A, Sing Andreas, Wildner M, Liebl B, Heinzinger S, Fingerle V, Hautmann W. Meldepflicht für Lyme-Borreliose in Bayern: Eine erste Bilanz. *Bayerisches Ärzteblatt.* 2015;(1):40–2.
37. BINDER E, DOEPFMER R, HORNSTEIN O. Experimentelle Übertragung des Erythema chronicum migrans von Mensch zu Mensch [Experimental transmission of chronic erythema migrans from man to man]. *Hautarzt.* 1955;6(11):494–6. ger.
38. Bitam I, Raoult D. Other tick-borne diseases in Europe. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;37130–54. eng. doi:10.1159/000213072
39. Blevins JS, Hagman KE, Norgard MV. Assessment of decorin-binding protein A to the infectivity of *Borrelia burgdorferi* in the murine models of needle and tick infection. *BMC Microbiol.* 2008;882. eng. doi:10.1186/1471-2180-8-82
40. Bockenstedt LK, Wormser GP. Review: unraveling Lyme disease. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.).* 2014;66(9):2313–23. eng. doi:10.1002/art.38756
41. Branda JA, Linskey K, Kim YA, Steere AC, Ferraro MJ. Two-tiered antibody testing for Lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole-cell sonicate enzyme immunoassay followed by a VlsE C6 peptide enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* 2011;53(6):541–7. eng. doi:10.1093/cid/cir464
42. Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, Hofmann H. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998;36(9):2658–65. eng.
43. Buchwald A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. *Vierteljahresschrift für Dermatologie und Syphilis.* 1883;10553–6.
44. Buechner SA, Lautenschlager S, Itin P, Bircher A, Erb P. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in patients with erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans, lymphadenosis benigna cutis, and morphea. *Arch Dermatol.* 1995;131(6):673–7.

45. Buechner SA. Lymphoproliferative Responses to *Borrelia burgdorferi* in Patients With Erythema Migrans, Acrodermatitis Chronica Atrophicans, Lymphadenosis Benigna Cutis, and Morphea. *Arch Dermatol.* 1995;131(6):673. doi:10.1001/archderm.1995.01690180047008
46. Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med.* 1984;57(4):515–20. eng.
47. Burgdorfer W. Arthropod-borne spirochetoses: a historical perspective. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001;20(1):1–5. eng.
48. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme Disease - A tick borne spirochetosis? *Science.* 1982;216:1317–9.
49. Callister SM, Case KL, Agger WA, Schell RF, Johnson RC, Ellingson JL. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoenner-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology.* 1990;28(2):363–5. eng.
50. Callister SM, Jobe DA, Stuparic-Stancic A, Miyamasu M, Boyle J, Dattwyler RJ, Arnaboldi PM. Detection of IFN-gamma Secretion by T Cells Collected Before and After Successful Treatment of Early Lyme Disease. *Clin. Infect. Dis.* 2016;62(10):1235–41. doi:10.1093/cid/ciw112
51. Cameron DJ, Johnson LB, Maloney EL. Evidence assessments and guideline recommendations in Lyme disease: the clinical management of known tick bites, erythema migrans rashes and persistent disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(9):1103–35. eng. doi:10.1586/14787210.2014.940900
52. Casjens S. *Borrelia* genomes in the year 2000. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000;2(4):401–10. eng.
53. Chandra A, Latov N, Wormser GP, Marques AR, Alaedini A. Epitope mapping of antibodies to VlsE protein of *Borrelia burgdorferi* in post-Lyme disease syndrome. *Clin. Immunol.* 2011;141(1):103–10. eng. doi:10.1016/j.jclim.2011.06.005
54. Chu C-Y, Liu W, Jiang B-G, Wang D-M, Jiang W-J, Zhao Q-M, Zhang P-H, Wang Z-X, Tang G-P, Yang H, Cao W-C. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008;46(9):3130–3. eng. doi:10.1128/JCM.01195-08
55. Coleman JL, Benach JL. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: their role in early diagnosis. *The Journal of Infectious Diseases.* 1987;155(4):756–65.
56. Coleman JL, Benach JL, Beck G, Habicht GS. Isolation of the outer envelope from *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1986;263(1-2):123–6. eng.
57. Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Ticks and for Enhancement of Spirochetemia in Mice. *Cell.* 1997;89(7):1111–9. doi:10.1016/S0092-8674(00)80298-6
58. Cook MJ. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med.* 2015;81–8. eng. doi:10.2147/IJGM.S73791
59. Craft JE, Fischer DK, Shimamoto GT, Steere AC. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J. Clin. Invest.* 1986;78(4):934–9. eng. doi:10.1172/JCI112683
60. Czerkinsky CC, Nilsson L-Å, Nygren H, Ouchterlony Ö, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods.* 1983;65(1-2):109–21. doi:10.1016/0022-1759(83)90308-3
61. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ, Thomas J, Golightly MG. Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N. Engl. J. Med.* 1988;319(22):1441–6. eng. doi:10.1056/NEJM198812013192203
62. Dressier F. The T-Cell Proliferative Assay in the Diagnosis of Lyme Disease. *Ann Intern Med.* 1991;115(7):533. doi:10.7326/0003-4819-115-7-533
63. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease. *Journal of Infectious Diseases.* 1993;167(2):392–400. doi:10.1093/infdis/167.2.392
64. Drouin EE, Seward RJ, Strle K, McHugh G, Katchar K, Londoño D, Yao C, Costello CE, Steere AC. A novel human autoantigen, endothelial cell growth factor, is a target of T and B cell responses in patients with Lyme disease. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):186–96. eng. doi:10.1002/art.37732
65. Eicken C, Sharma V, Klabunde T, Lawrenz MB, Hardham JM, Norris SJ, Sacchettini JC. Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 2002;277(24):21691–6. eng. doi:10.1074/jbc.M201547200

66. Ekerfelt C, Forsberg P, Svenvik M, Roberg M, Bergström S, Ernerudh J. Asymptomatic *Borrelia*-seropositive individuals display the same incidence of *Borrelia*-specific interferon-gamma (IFN-gamma)-secreting cells in blood as patients with clinical *Borrelia* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1999;115(3):498–502. eng.
67. Ekerfelt C, Masreliez C, Svenvik M, Ernerudh J, Roberg M, Forsberg P. Antibodies and T-cell reactivity to *Borrelia burgdorferi* in an asymptomatic population: a study of healthy blood donors in an inland town district in the south-east of Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 2001;33(11):806–8. eng.
68. Elbaum-Garfinkle S. Close to home: a history of Yale and Lyme disease. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2011 [cited 2015 Mar 16];84(2):103–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3117402/>
69. Embers ME, Ramamoorthy R, Philipp MT. Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *Microbes and Infection.* 2004;6(3):312–8. doi:10.1016/j.micinf.2003.11.014
70. Eriksson P, Schröder MT, Niiranen K, Nevanlinna A, Panelius J, Ranki A. The many faces of solitary and multiple erythema migrans. *Acta Derm. Venereol.* 2013;93(6):693–700. eng. doi:10.2340/00015555-1549
71. European centre for disease prevention and control. *Ixodes ricinus* [Internet] [cited 2015 Apr 5]. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/ticks/Pages/ixodes-ricinus.aspx>
72. Faresjö M. The challenge of measuring elusive immune markers by enzyme-linked immuno-spot (ELISPOT) technique. *Methods Mol. Biol.* 2014;11723–12. eng. doi:10.1007/978-1-4939-0928-5_1
73. Feder HM, Johnson, Barbara J B, O'Connell S, Shapiro ED, Steere AC, Wormser GP, Agger WA, Artsob H, Auwaerter P, Dumler JS, Bakken JS, Bockenstedt LK, Green J, Dattwyler RJ, Munoz J, Nadelman RB, Schwartz I, Draper T, McSwegan E, Halperin JJ, Klempner MS, Krause PJ, Mead P, Morshed M, Porwancher R, Radolf JD, Smith RP, Sood S, Weinstein A, Wong SJ, Zemel L. A critical appraisal of \"chronic Lyme disease\". *N. Engl. J. Med.* 2007;357(14):1422–30. eng. doi:10.1056/NEJMra072023
74. Fikrig E, Narasimhan S. *Borrelia burgdorferi*--traveling incognito? *Microbes Infect.* 2006;8(5):1390–9. eng. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.022
75. Fingerle V. Die Lyme Borreliose [Internet]: Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. 2008 [updated 2013 Mar 1]. Available from: http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/borreliose/lyme.htm## NLM Identifier: 01.04.2015.
76. Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljic E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008;298(3-4):279–90. eng. doi:10.1016/j.ijmm.2007.05.002
77. Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, Roberg M, Vrethem M, Bergström S. The outer surface proteins of Lyme disease *borrelia* spirochetes stimulate T cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin. Exp. Immunol.* 1995;101(3):453–60. eng.
78. Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2007;Chapter 66. eng. doi:10.1002/0471142735.im0624s78
79. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 1997;390(6660):580–6. eng. doi:10.1038/37551
80. Gern L, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Krampitz HE. The Ecology of Lyme Borreliosis in Europe. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 59–69.
81. Gern L. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;3718–30. eng. doi:10.1159/000213068
82. Girschick HJ, Huppertz HI, Rössman H, Krenn V, Karch H. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol Int.* 1996;16(3):125–32. doi:10.1007/BF01409985
83. Godar DA, Laniosz V, Wetter DA. Lyme disease update for the general dermatologist. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16(1):5–18. eng. doi:10.1007/s40257-014-0108-2
84. Goodman JL. The diagnosis of Lyme disease: good news, bad news. *Am. J. Med.* 2001;110(3):236–8. eng.

85. Göttner G, Schulte-Spechtel U, Wilske B. Heterogeneity of the immunodominant surface protein VlsE among the three genospecies of *Borrelia burgdorferi* pathogenic for humans. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004;293 Suppl 37172–3. eng.
86. Grab DJ, Lanners H, Martin LN, Chesney J, Cai C, Adkisson HD, Bucala R. Interaction of *Borrelia burgdorferi* with peripheral blood fibrocytes, antigen-presenting cells with the potential for connective tissue targeting. *Mol. Med.* 1999;5(1):46–54. eng.
87. Gray J. The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental and Applied Acarology.* 1998;22249–58.
88. Guzman I, Gelman H, Tai J, Gruebele M. The extracellular protein VlsE is destabilized inside cells. *J Mol Biol.* 2014;426(1):11–20. doi:10.1016/j.jmb.2013.08.024
89. Hagen J, Houchins JP, Kalyuzhny AE. Combining ELISPOT and ELISA to measure amounts of cytokines secreted by a single cell. *Methods Mol. Biol.* 2012;792115–22. doi:10.1007/978-1-61779-325-7_10
90. Halperin JJ. Nervous system Lyme disease. *Handb Clin Neurol.* 2014;1211473–83. eng. doi:10.1016/B978-0-7020-4088-7.00099-7
91. Halperin JJ, Baker P, Wormser GP. Common misconceptions about Lyme disease. *Am. J. Med.* 2013;126(3):264. eng. doi:10.1016/j.amjmed.2012.10.008
92. Hansmann Y. Treatment and prevention of Lyme disease. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;37111–29. eng. doi:10.1159/000213071
93. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999;37(7):2241–7.
94. Hayes SF, Burgdorfer W. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi*. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 29–43.
95. Herzer P. Joint Manifestations. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 168–84.
96. Herzer P, Fingerle V, Pfister H-W, Krause A. Lyme-Borreliose [Lyme borreliosis]. *Internist (Berl).* 2014;55(7):789. ger. doi:10.1007/s00108-013-3412-7
97. Hinckley AF, Connally NP, Meek JI, Johnson BJ, Kemperman MM, Feldman KA, White JL, Mead PS. Lyme disease testing by large commercial laboratories in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2014;59(5):676–81. eng. doi:10.1093/cid/ciu397
98. Hollström E. Successful treatment of erythema chronicum migrans Afzelius. *Acta Derm. Venereol.* 1951;21235–43.
99. Homouz D, Perham M, Samiotakis A, Cheung MS, Wittung-Stafshede P. Crowded, cell-like environment induces shape changes in aspherical protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11754–9. doi:10.1073/pnas.0803672105
100. Horowitz HW, Pavia CS, Bittker S, Forseter G, Cooper D, Nadelman RB, Byrne D, Johnson RC, Wormser GP. Sustained cellular immune responses to *Borrelia burgdorferi*: lack of correlation with clinical presentation and serology. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994;1(4):373–8. eng.
101. Hovmark A, Asbrink E, Weber K, Kaudewitz P. Borrelial Lymphocytoma. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 122–30.
102. Hubálek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* 1997;13(8):951–7. eng.
103. Hubálek Z. Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;3731–50. eng. doi:10.1159/000213069
104. Hunfeld KP, Kraiczky P. When is the best time to order a Western blot and how should it be interpreted? *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;37167–77. eng. doi:10.1159/000213074
105. Huppertz HI, Mösbauer S, Busch DH, Karch H. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adolescents. *Eur. J. Pediatr.* 1996;155(4):297–302. eng.
106. invitrogen by life technologies. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System: User Guide [Internet].
107. Jacek E, Tang KS, Komorowski L, Ajamian M, Probst C, Stevenson B, Wormser GP, Marques AR, Alaedini A. Epitope-Specific Evolution of Human B Cell Responses to *Borrelia burgdorferi* VlsE Protein from Early to Late Stages of Lyme Disease. *J. Immunol.* 2016;196(3):1036–43. doi:10.4049/jimmunol.1501861

108. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 2009;18(1):24–36. doi:10.1002/pro.3
109. Jauris-Heipke S, Fuchs R, Motz M, Preac-Mursic V, Schwab E, Soutschek E, Will G, Wilske B. Genetic heterogeneity of the genes coding for the outer surface protein C (OspC) and the flagellin of *Borrelia burgdorferi*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1993;182(1):37–50.
110. Jin C, Roen DR, Lehmann PV, Kellermann GH. An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells.* 2013;2(3):607–20. eng. doi:10.3390/cells2030607
111. Jones K, Guidry J, Wittung-Stafshede P. Characterization of surface antigen from Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001;289(2):389–94. eng. doi:10.1006/bbrc.2001.5983
112. Kaiser R, Fingerle V, Hofmann H, Krause A. Aktuelle Aspekte zur Lyme-Borreliose. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed.* 2011;46426–37.
113. Kalish RS, Wood JA, Golde W, Bernard R, Davis LE, Grimson RC, Coyle PK, Luft BJ. Human T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* infection: no correlation between human leukocyte function antigen type 1 peptide response and clinical status. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003;187(1):102–8. eng. doi:10.1086/346059
114. Kalyuzhny AE. *Handbook of ELISPOT: Methods and protocols.* 2nd ed. Totowa, N.J.: Humana Press; 2012. 1 online resource (x, 261. (Methods in molecular biology, 1940-6029; vol. 792).
115. Kaufman WR. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitol. Today (Regul. Ed.).* 1989;5(2):47–56. eng.
116. Kelesidis T. The Cross-Talk between Spirochetal Lipoproteins and Immunity. *Front Immunol.* 2014;5310. eng. doi:10.3389/fimmu.2014.00310
117. Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012;66(1):1–19. eng. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00980.x
118. Kindstrand E, Nilsson BY, Hovmark A, Nennesmo I, Pirskanen R, Solders G, Asbrink E. Polyneuropathy in late Lyme borreliosis - a clinical, neurophysiological and morphological description. *Acta Neurol. Scand.* 2000;101(1):47–52. eng.
119. Klemptner MS, Schmid CH, Hu L, Steere AC, Johnson G, McCloud B, Noring R, Weinstein A. Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. *Am. J. Med.* 2001;110(3):217–9. eng.
120. Klemptner MS, Baker PJ, Shapiro ED, Marques A, Dattwyler RJ, Halperin JJ, Wormser GP. Treatment trials for post-Lyme disease symptoms revisited. *Am. J. Med.* 2013;126(8):665–9. eng. doi:10.1016/j.amjmed.2013.02.014
121. Klinman D. ELISPOT assay to detect cytokine-secreting murine and human cells. *Curr Protoc Immunol.* 2008;Chapter 66. eng. doi:10.1002/0471142735.im0619s83
122. Koning J de, Duray PH. Histopathology of Human Lyme Borreliosis. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 70–92.
123. Kraiczy P, Rossmann E, Brade V, Simon MM, Skerka C, Zipfel PF, Wallich R. Binding of human complement regulators FHL-1 and factor H to CRASP-1 orthologs of *Borrelia burgdorferi*. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2006;118(21–22):669–76. eng. doi:10.1007/s00508-006-0691-1
124. Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: Insufficient killing of the pathogens by complement and antibody. *International Journal of Medical Microbiology.* 2002;291141–6. doi:10.1016/S1438-4221(02)80027-3
125. Krause A, Burmester GR, Rensing A, Schoerner C, Schaible UE, Simon MM, Herzer P, Kramer MD, Wallich R. Cellular immune reactivity to recombinant OspA and flagellin from *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Complexity of humoral and cellular immune responses. *J. Clin. Invest.* 1992;90(3):1077–84. eng. doi:10.1172/JCI115923
126. Krause A, Kalden JR, Burmester GR, Brade V, Schoerner C, Solbach W. T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. *Arthritis & Rheumatism.* 1991;34(4):393–402. doi:10.1002/art.1780340404
127. Kumar Singh S, Josef Girschick H. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Lancet Infectious Diseases.* 2004;4(9):575–83. doi:10.1016/S1473-3099(04)01132-6
128. Lantos PM. Chronic Lyme disease: the controversies and the science. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(7):787–97. eng. doi:10.1586/eri.11.63

129. Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP, Norris SJ. Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 1999 [cited 2015 Mar 16];37(12):3997–4004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lawrenz+MB%2C+Hardham+JM%2C+Owens+RT%2C+et+al.+Human+antibody+responses+to+VlsE+antigenic+variation+protein+of+Borrelia>
130. Lebech AM, Hansen K, Wilske B, Theisen M. Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. *Med. Microbiol. Immunol.* [Internet]. 1994 [cited 2015 Mar 17];183(6):325–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541107>
131. Lemgruber L, Sant'Anna C, Griffiths C, Abud Y, Mhlana M, Wallich R, Frischknecht F. Nanoscopic Localization of Surface-Exposed Antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Microsc. Microanal.* 2015;1–9. ENG. doi:10.1017/S1431927615000318
132. LENNHOFF C. Spirochaetes in aetiologically obscure diseases. *Acta Derm. Venereol.* 1948;28(3):295–324. eng.
133. Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, Ruscio M, Voet PE, Weynants VE, Philipp MT. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. *The Journal of Infectious Diseases.* 2000;182(5):1455–62. eng. doi:10.1086/315862
134. Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT. An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 1999;163(10):5566–73. eng.
135. Liang FT, Bowers LC, Philipp MT. C-terminal invariable domain of VlsE is immunodominant but its antigenicity is scarcely conserved among strains of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 2001;69(5):3224–31. eng. doi:10.1128/IAI.69.5.3224-3231.2001
136. Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1999;67(12):6702–6. eng.
137. Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJ, Miller JN, Philipp MT. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* vlsE. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 1999 [cited 2015 Mar 12];37(12):3990–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85863/>
138. Liang FT, Jacobs MB, Bowers LC, Philipp MT. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *J. Exp. Med.* 2002;195(4):415–22. eng.
139. Liang FT, Yan J, Mbow ML, Sviat SL, Gilmore RD, Mamula M, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect. Immun.* 2004;72(10):5759–67. eng. doi:10.1128/IAI.72.10.5759-5767.2004
140. Lindgren E, Jaenson T. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures [Internet]. 2006. Available from: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/96819/E89522.pdf
141. MacPherson G, Austyn J, Hammelehle R. *Exploring immunology: Concepts and evidence.* Weinheim: Wiley-Blackwell; 2012. 351 p. eng.
142. Maiwald M, Oehme R, March O, Petney TN, Kimmig P, Naser K, Zappe HA, Hassler D, von Knebel Doeberitz M. Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. *Epidemiol. Infect.* 1998;121(1):103–8. eng.
143. Malherbe L. T-cell epitope mapping. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 2009;103(1):76–9. doi:10.1016/S1081-1206(10)60147-0
144. Maraspin V, Strle F. How do I manage tick bites and Lyme borreliosis in pregnant women? *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;37:183–90. eng. doi:10.1159/000213076
145. Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(16):5410–6. eng. doi:10.1128/AEM.00116-09
146. Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* 2011;11(7):1545–63. eng. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.022

147. Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao W-C, Chu C, Scholz H, Straubinger RK, Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013;63(Pt 11):4284–8. eng. doi:10.1099/ijss.0.052001-0
148. Martin R, Kohlhepp W, Mertens HG. Chronic Central Nervous System Involvement. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 205–18.
149. May EF, Jabbari B. Stroke in neuroborreliosis. *Stroke*. 1990;21(8):1232–5. doi:10.1161/01.STR.21.8.1232
150. McDowell JV, Sung S-Y, Hu LT, Marconi RT. Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 2002;70(8):4196–203.
151. McKisic MD, Barthold SW. T-cell-independent responses to *Borrelia burgdorferi* are critical for protective immunity and resolution of lyme disease. *Infect. Immun.* 2000;68(9):5190–7.
152. ME E, al e, Embers ME, Jacobs MB, Johnson, Barbara J B, Philipp MT. Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi*... - PubMed - NCBI // Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007;14(8):931–6. eng. doi:10.1128/CVI.00075-07
153. Mullegger RR, Glatz M. Is serological follow-up useful for patients with cutaneous Lyme borreliosis? *Curr. Probl. Dermatol.* 2009;37178–82. eng. doi:10.1159/000213075
154. Mullegger RR. Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. *Eur J Dermatol* [Internet]. 2004 [cited 2015 Mar 13];14(5):296–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358567>
155. Müllegger RR, Glatz M. Skin manifestations of lyme borreliosis: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* 2008;9(6):355–68. eng.
156. Müller I, Freitag MH, Poggensee G, Scharnetzky E, Straube E, Schoerner C, Hlobil H, Hagedorn H-J, Stanek G, Schubert-Unkmeir A, Norris DE, Gensichen J, Hunfeld K-P. Evaluating frequency, diagnostic quality, and cost of Lyme borreliosis testing in Germany: a retrospective model analysis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012595427. eng. doi:10.1155/2012/595427
157. Nau R, Christen H-J, Eiffert H. Lyme disease--current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106(5):72. eng. doi:10.3238/arztebl.2009.0072
158. Nelson R. Controversy brewing over Lyme disease testing. *The Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(10):605. doi:10.1016/S1473-3099(05)70233-4
159. Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, Skogman BH, Nyberg C, Ernerudh J, Eliasson I, Ekerfelt C. Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? *Cells*. 2012;1(2):153–67. doi:10.3390/cells1020153
160. Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* 1992;60(11):4662–72. eng.
161. Norris SJ. vls Antigenic Variation Systems of Lyme Disease *Borrelia*: Eluding Host Immunity through both Random, Segmental Gene Conversion and Framework Heterogeneity. *Microbiol Spectr.* 2014;2(6). eng. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0038-2014
162. Oliveira CR, Shapiro ED. Update on persistent symptoms associated with Lyme disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 2015;27(1):100–4. eng. doi:10.1097/MOP.0000000000000167
163. Pachner AR, Dail D, Li L, Gurey L, Feng S, Hodzic E, Barthold S. Humoral Immune Response Associated with Lyme Borreliosis in Nonhuman Primates: Analysis by Immunoblotting and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Sonicates or Recombinant Proteins. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2002;9(6):1348–55. doi:10.1128/CDLI.9.6.1348-1355.2002
164. Pachner AR, Steiner I. Lyme neuroborreliosis: infection, immunity, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2007;6(6):544–52. eng. doi:10.1016/S1474-4422(07)70128-X
165. Peacock BN, Gherezghiher TB, Hilario JD, Kellermann GH. New insights into Lyme disease. *Redox Biol.* 2015;566–70. ENG. doi:10.1016/j.redox.2015.03.002
166. Peterson PK, Clawson CC, Lee DA, Garlich DJ, Quie PG, Johnson RC. Human phagocyte interactions with the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* 1984;46(2):608–11. eng.
167. Pfister HW, Einhäupl KM, Wilske B, Preac-Mursic V. Bannwarth's syndrome and the enlarged neurological spectrum of arthropod-borne borreliosis. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A*. 1987;263(3):343–7. eng.

168. Pfister HW, Kristoferitsch W, Meier C. Early Neurological Involvement (Bannwarth's Syndrome). In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. Aspects of Lyme Borreliosis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 152–67.
169. Pfister H-W, Wilske B, Weber K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. The Lancet. 1994;343(8904):1013–6. doi:10.1016/S0140-6736(94)90130-9
170. Pohl-Koppe A, Kaunicnik A, Wilske B. Characterization of the cellular and humoral immune response to outer surface protein C and outer surface protein 17 in children with early disseminated Lyme borreliosis. Med. Microbiol. Immunol. 2001;189(4):193–200. doi:10.1007/s004300100062
171. Poljak A, Comstedt P, Hanner M, Schüler W, Meinke A, Wizel B, Lundberg U. Identification and characterization of Borrelia antigens as potential vaccine candidates against Lyme borreliosis. Vaccine. 2012;30(29):4398–406. eng. doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.073
172. Prabhakar U, Kelley M, editors. Validation of Cell-Based Assays in the GLP Setting. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008.
173. Preac-Mursic V, Wilske B. Biology of Borrelia burgdorferi. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. Aspects of Lyme Borreliosis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 44–58.
174. Pulzova L, Bhide M. Outer surface proteins of Borrelia: peerless immune evasion tools. Curr. Protein Pept. Sci. 2014;15(1):75–88. eng.
175. Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature. 2005;436(7050):573–7. eng. doi:10.1038/nature03812
176. Ramamoorthy R, Scholl-Meeker D. Borrelia burgdorferi proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH. Infect. Immun. 2001;69(4):2739–42. eng. doi:10.1128/IAI.69.4.2739-2742.2001
177. Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. Curr Opin Immunol. 1995;7(1):85–96.
178. Reimer B, Erbas B, Lobbichler K, Truckenbrodt R, Gartner-Kothe U, Kapeller N, Hansen M, Fingerle V, Wilske B, Sonnenburg F v. Seroprevalence of Borrelia infection in occupational tick-exposed people in Bavaria (Germany). Int. J. Med. Microbiol. 2002;291 Suppl 33215. eng.
179. Reimers CD, Schmutzhard E. Myalgia, Myositis, and Fasciitis. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. Aspects of Lyme Borreliosis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 185–92.
180. Robert Koch Institut. Zur Lyme-Borreliose in ausgewählten Bundesländern in den Jahren 1997 und 1998 [Internet]: RKI - Epidemiologisches Bulletin. 1999 [cited 2015 Apr 6]. Available from: http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reluZvEgH0xvc/PDF/20ZTP9qRTM13.pdf
181. Roessler D, Hauser U, Wilske B. Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of Borrelia burgdorferi sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35(11):2752–8.
182. Roessner K, Fikrig E, Russell JQ, Cooper SM, Flavell RA, Budd RC. Prominent T lymphocyte response to Borrelia burgdorferi from peripheral blood of unexposed donors. Eur. J. Immunol. 1994;24(2):320–4. eng. doi:10.1002/eji.1830240207
183. Rogovskyy AS, Casselli T, Tourand Y, Jones CR, Owen JP, Mason KL, Scoles GA, Bankhead T. Evaluation of the Importance of VlsE Antigenic Variation for the Enzootic Cycle of Borrelia burgdorferi. PLoS ONE. 2015;10(4):e0124268. doi:10.1371/journal.pone.0124268
184. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. Updates on Borrelia burgdorferi sensu lato complex with respect to public health. Ticks Tick Borne Dis. 2011;2(3):123–8. eng. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.04.002
185. Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister H-W. The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. Mol. Med. 2008;14(3-4):205–12. eng. doi:10.2119/2007-00091.Rupprecht
186. Rutherford ST, Bassler BL. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2(11). eng. doi:10.1101/cshperspect.a012427
187. Sapi E, Bastian SL, Mpoy CM, Scott S, Rattelle A, Pabbati N, Poruri A, Burugu D, Theophilus, Priyanka A S, Pham TV, Datar A, Dhaliwal NK, MacDonald A, Rossi MJ, Sinha SK, Luecke DF. Characterization of biofilm formation by Borrelia burgdorferi in vitro. PLoS ONE. 2012;7(10):e48277. eng. doi:10.1371/journal.pone.0048277
188. Satz N. Klinik der Lyme-Borreliose. 2nd ed. Bern [u.a.]: Huber; 2002. 279 S.

189. Schempp C, Owsianowski M, Lange R, Gollnick H. Comparison of *Borrelia burgdorferi* ultrasonicate and whole B, burgdorferi cells as a stimulus for T-cell proliferation and GM-CSF secretion in vitro. *Zentralbl. Bakteriol.* 1993;279(3):417–25. eng.
190. Schlingmann TR, Shive CL, Targoni OS, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Increased per cell IFN-gamma productivity indicates recent in vivo activation of T cells. *Cell Immunol.* 2009;258(2):131–7. doi:10.1016/j.cellimm.2009.04.002
191. Schoeler GB, Manweiler SA, Wikel SK. Ixodes scapularis: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp. Parasitol.* 1999;92(4):239–48. eng. doi:10.1006/expr.1999.4426
192. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. In: Alt FW, editor. *Advances in immunology*, Volume 96. New York, N.Y: Academic Press; 2007. p. 41–101. (*Advances in Immunology*; vol. 96).
193. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163–89. doi:10.1189/jlb.0603252
194. Schuijt TJ, Hovius JW, van der Poll, T, van Dam, A P, Fikrig E. Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future. *Trends Parasitol.* 2011;27(1):40–7. eng. doi:10.1016/j.pt.2010.06.006
195. Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000;38(1):382–8. eng.
196. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A, Benichou G, Miller A, Moudgil K. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:729–66. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.003501
197. Seriburi V, Ndukwe N, Chang Z, Cox ME, Wormser GP. High frequency of false positive IgM immunoblots for *Borrelia burgdorferi* in clinical practice. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(12):1236–40. eng. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03749.x
198. Seshu J, Skare JT. The many faces of *Borrelia burgdorferi*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000;2(4):463–72. eng.
199. Shapiro ED. Repeat or persistent Lyme disease: persistence, recrudescence or reinfection with *Borrelia Burgdorferi*? *F1000Prime Rep.* 2015;7:11. eng. doi:10.12703/P7-11
200. Sillanpää H, Lahdenne P, Sarvas H, Arnez M, Steere A, Peltomaa M, Seppälä I. Immune responses to borrelial VlsE IR6 peptide variants. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007;297(1):45–52. eng. doi:10.1016/j.ijmm.2006.09.001
201. Sillanpää H, Skogman BH, Sarvas H, Seppälä, Ilkka J T, Lahdenne P. Antibodies to decorin-binding protein B (DbpB) in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis in children. *Int. J. Infect. Dis.* 2014;28:160–3. eng. doi:10.1016/j.ijid.2014.07.006
202. Skogman BH, Hellberg S, Ekerfelt C, Jenmalm MC, Forsberg P, Ludvigsson J, Bergström S, Ernerudh J. Adaptive and innate immune responsiveness to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in exposed asymptomatic children and children with previous clinical Lyme borreliosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012:294587. eng. doi:10.1155/2012/294587
203. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol.* 1983;3(12):2156–65.
204. Soloski MJ, Crowder LA, Lahey LJ, Wagner CA, Robinson WH, Aucott JN. Serum inflammatory mediators as markers of human Lyme disease activity. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e93243. eng. doi:10.1371/journal.pone.0093243
205. Sood SK, editor. *Lyme Borreliosis in Europe and North America*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2011.
206. Sood SK, O'Connell S, Weber K. The Emergence and Epidemiology of Lyme Borreliosis in Europe and North America. In: Sood SK, editor. *Lyme Borreliosis in Europe and North America*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2011. p. 1–35.
207. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld K-P, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011;17(1):69–79. eng. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x
208. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. *The Lancet.* 2003;362(9396):1639–47. doi:10.1016/S0140-6736(03)14798-8

209. Stanek G, editor. Proceedings of the 2. International Symposium on Lyme Disease and Related Disorders: Vienna 1985. Stuttgart, New York: Fischer; 1987. XIII, 501 S. (Lyme borreliosis; vol. [1]).
210. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *The Lancet*. 2012;379(9814):461–73. doi:10.1016/S0140-6736(11)60103-7
211. Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Intern Med*. 1980;93(1):8–16. eng.
212. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med*. 1983;308(13):733–40. eng. doi:10.1056/NEJM198303313081301
213. Steere AC, Hardin JA, Ruddy S, Mummaw JG, Malawista SE. Lyme arthritis: correlation of serum and cryoglobulin IgM with activity, and serum IgG with remission. *Arthritis Rheum*. 1979;22(5):471–83. eng.
214. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*. 1977;20(1):7–17. eng.
215. Steere AC, Dhar A, Hernandez J, Fischer PA, Sikand VK, Schoen RT, Nowakowski J, McHugh G, Persing DH. Systemic symptoms without erythema migrans as the presenting picture of early Lyme disease. *Am. J. Med*. 2003;114(1):58–62. eng.
216. Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for lyme disease. *Clin. Infect. Dis*. 2008;47(2):188–95. eng. doi:10.1086/589242
217. Stevanovic S, Schild H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol*. 1999;11(6):375–84. doi:10.1006/smim.1999.0195
218. Stevenson B, Babb K. LuxS-mediated quorum sensing in *Borrelia burgdorferi*, the lyme disease spirochete. *Infect. Immun*. 2002;70(8):4099–105. eng.
219. Stokes JV, Moraru GM, McIntosh C, Kummari E, Rausch K, Varela-Stokes AS. Differentiated THP-1 Cells Exposed to Pathogenic and Nonpathogenic *Borrelia* Species Demonstrate Minimal Differences in Production of Four Inflammatory Cytokines. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016;16(11):691–5. doi:10.1089/vbz.2016.2006
220. Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol*. 2009;3751–110. eng. doi:10.1159/000213070
221. Strle F, Videcnik J, Zorman P, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Maraspin V. Clinical and epidemiological findings for patients with erythema migrans. Comparison of cohorts from the years 1993 and 2000. *Wien. Klin. Wochenschr*. 2002;114(13-14):493–7. eng.
222. Sundararaman S, Karulin AY, Ansari T, BenHamouda N, Gottwein J, Laxmanan S, Levine SM, Loffredo JT, McArdle S, Neudoerfl C, Roen D, Silina K, Welch M, Lehmann PV. High Reproducibility of ELISPOT Counts from Nine Different Laboratories. *Cells*. 2015;4(1):21–39. eng. doi:10.3390/cells4010021
223. Szulzyk T, Flisiak R. Lyme borreliosis. *Annals of Parasitology [Internet]*. 2012 [cited 2015 Mar 12];58(2):63–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lyme+borreliosis+Tomasz+Szul%C5%BCyk%2C+Robert+Flisiak>
224. Tai J, Dave K, Hahn V, Guzman I, Gruebele M. Subcellular modulation of protein VlsE stability and folding kinetics. *FEBS Lett*. 2016;590(10):1409–16. doi:10.1002/1873-3468.12193
225. Tanguay S, Killion JJ. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res*. 1994;13(4):259–63.
226. Tary-Lehmann M, Hamm CD, Lehmann PV. Validating Reference Samples for Comparison in a Regulated ELISPOT Assay. In: Prabhakar U, Kelley M, editors. *Validation of Cell-Based Assays in the GLP Setting*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008. p. 127–46.
227. Templeton TJ. *Borrelia* outer membrane surface proteins and transmission through the tick. *J. Exp. Med*. 2004;199(5):603–6. eng. doi:10.1084/jem.20040033
228. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187–200. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014
229. Tokarz R, Anderton JM, Katona LI, Benach JL. Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA array. *Infect. Immun*. 2004;72(9):5419–32. eng. doi:10.1128/IAI.72.9.5419-5432.2004

230. Topakian R, Stieglbauer K, Aichner FT. Unexplained cerebral vasculitis and stroke: keep Lyme neuroborreliosis in mind. *The Lancet Neurology*. 2007;6(9):756–7. doi:10.1016/S1474-4422(07)70203-X
231. Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T. Limitation of serological testing for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and western blot in comparison with PCR and culture methods. *Wien. Klin. Wochenschr*. 2002;114(13-14):601–5. eng.
232. van der Linde M. R., Ballmer PE. Lyme Carditis. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 131–51.
233. Vancurova I. *Cytokine Bioassays*. New York, NY: Springer New York; 2014. (vol. 1172).
234. Vasudevan B, Chatterjee M. Lyme borreliosis and skin. *Indian J Dermatol*. 2013;58(3):167–74. eng. doi:10.4103/0019-5154.110822
235. Vaz A, Glickstein L, Field JA, McHugh G, Sikand VK, Damle N, Steere AC. Cellular and humoral immune responses to *Borrelia burgdorferi* antigens in patients with culture-positive early Lyme disease. *Infect. Immun*. 2001;69(12):7437–44. eng. doi:10.1128/IAI.69.12.7437-7444.2001
236. Wang G, van Dam A P, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev*. 1999;12(4):633–53. eng.
237. Weber K. Aspects of Lyme borreliosis in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2001;20(1):6–13. eng.
238. Weber K, Pfister H-W, Reimers CD. Clinical Overview. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 93–104.
239. Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993.
240. Weber K, Burgdorfer W, Schierz G. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. 1 online resource (ix, 384).
241. Weinstein A. Editorial commentary: laboratory testing for Lyme disease: time for a change? *Clin. Infect. Dis*. 2008;47(2):196–7. eng. doi:10.1086/589316
242. Wilske B, Preac-Mursic V. Microbiological Diagnosis of Lyme Borreliosis. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. *Aspects of Lyme Borreliosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993. p. 267–99.
243. Wilske B. *Lyme-Borreliose*. München [u.a.]: Urban & Fischer; 2000. 59 S. (MiQ; vol. 12).
244. Wilske B. *MiQ*. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: G. Fischer; 2000. 59 S.
245. Wilske B. *MiQ*. München, Jena: Urban und Fischer; 2000. 59 S.
246. Wilske B. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann. Med*. 2005;37(8):568–79. eng. doi:10.1080/07853890500431934
247. Wilske B, Fingerle V, Hauser U, Lehnert G, Jauris-Heipke S. Implications of antigenic heterogeneity for Lyme borreliosis diagnosis. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1999;289(5-7):675–7. doi:10.1016/S0934-8840(99)80029-2
248. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2007;49(1):13–21. eng. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00139.x
249. Wormser GP, Brisson D, Liveris D, Hanincová K, Sandigursky S, Nowakowski J, Nadelman RB, Ludin S, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;198(9):1358–64. eng. doi:10.1086/592279
250. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*. 2006;43(9):1089–134. eng. doi:10.1086/508667
251. YI-SHU WU, WEI-FEN Z, FANG-PO F, BAO-ZHEN W, YUAN-JIN Z. Atypical cutaneous lesions of Lyme disease. *Clin Exp Dermatol*. 1993;18(5):434–6. doi:10.1111/j.1365-2230.1993.tb02244.x
252. Zajkowska J, Garkowski A, Moniuszko A, Czupryna P, Ptaszyńska-Sarosiek I, Tarasów E, Ustymowicz A, Łebkowski W, Pancewicz S. Vasculitis and stroke due to Lyme neuroborreliosis - a review. *Infect Dis (Lond)*. 2015;47(1):1–6. eng. doi:10.3109/00365548.2014.961544
253. Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*. 1997;89(2):275–85. eng // ENG.

- 254. Zhang JR, Norris SJ. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect. Immun.* 1998;66(8):3698–704. eng.
- 255. Zhang JR, Norris SJ. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of *vlsE* in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 1998;66(8):3689–97. eng.
- 256. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557–69. eng. doi:10.1182/blood-2008-05-078154
- 257. Zöller L, Cremer J, Faulde M. Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis.* 1993;14(9):937–44. eng.
- 258. Zoschke DC. Lymphoproliferative Responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme Disease. *Ann Intern Med.* 1991;114(4):285. doi:10.7326/0003-4819-114-4-285
- 259. Zückert WR. A call to order at the spirochaetal host-pathogen interface. *Mol Microbiol.* 2013;89(2):207–11. eng. doi:10.1111/mmi.12286

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Josef Köstler für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anzufertigen, die Bereitstellung des interessanten Themas sowie der ausgezeichneten Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Ermöglichung des Arbeitsplatzes am Institut für klinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg und die Begutachtung meiner Arbeit als erster Berichterstatter. Ich danke auch Herr Professor Uwe Ritter für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein herzlicher Dank gilt dem gesamten Team der Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit, die hervorragenden Erklärungen und Anleitungen. Mein besonderer Dank gilt Karin Lukas, sie hat mir stets bei auftretenden Problemen geholfen und mir zahlreiche Hilfestellungen gegeben. Ebenso herzlich möchte ich mich auch bei Silvia Allmeier und Eveline Lang für Ihre Unterstützung bedanken.

Meinem Bruder Christian danke ich ebenso sehr für seine Ermunterungen und Hilfe. Ganz lieben Dank an Jojo für die sprachliche Korrektur und ihr stets offenes Ohr und Herz in allen Lebenslagen. Meinem Freund Andi danke ich besonders für seine stärkenden Worte, seine endlose Geduld und den steten Rückhalt den er mir gibt.

Von tiefsten Herzen Danke ich meiner gesamten Familie, insbesondere meinen lieben Eltern, ohne sie wäre das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

11 Erklärung

“Ich, Carmen Putz geboren am 21.05.1985 in Dachau, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift
des Promovenden